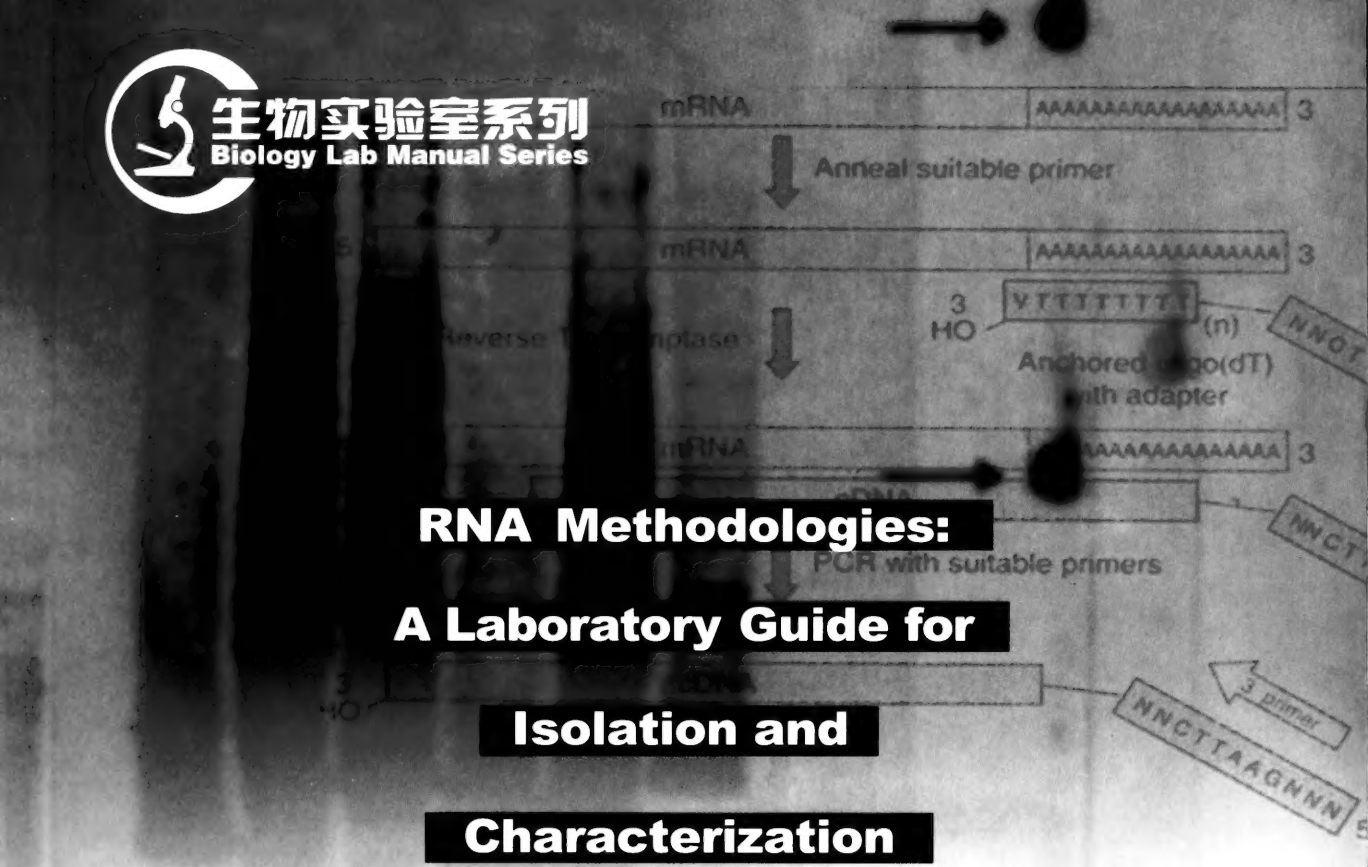


RNA Methodologies:

A Laboratory Guide for

Isolation and

Characterization

RNA

分离与鉴定实验指南

——RNA研究方法

（原著第三版）

[美] R. E. 法雷尔（Robert E. Farrell, Jr.）编

金由辛　刘建华　金　言　等译

化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物实验室系列

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004 年 3 月)
- 生物化学实验技术 (2005 年 5 月重印)
- 拟南芥实验手册［影印］ (2004 年 5 月)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2005 年 6 月重印)
- 转基因动物技术手册［译］ (2004 年 10 月)
- RNAi——基因沉默指南［译］ (2004 年 10 月)
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (2005 年 1 月)
- 生物安全柜应用指南 (2005 年 3 月)
- 分子生物学实验参考手册［译］ (2005 年 6 月)
- DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 (2005 年 6 月)
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册［译］ (2005 年 7 月)
- 医学微生物学实验技术 (2006 年 1 月)
- 小鼠胚胎操作实验手册（第三版）［译］ (2006 年 1 月)
- 植物分子生物技术应用手册 (2006 年 2 月)
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法［译］ (2006 年 2 月)
- PCR 技术实验指南（第二版)［译］ (2006 年 3 月)
- 植物细胞工程实验技术 (2006 年 4 月)
- 生物安全实验室建设 (2006 年 4 月)
- 人肿瘤细胞培养［译］ (2006 年 5 月)
- 细胞生物学实验技术 (2006 年 6 月)
- 组织工程方法［译］ (2006 年 6 月)
- 免疫组织化学实验技术及应用 (2006 年 6 月)
- 生物芯片技术应用详解 (2006 年 9 月)
- 现代实验动物学技术 (2007 年 1 月)
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南［译］ (2006 年 10 月)
- RNA 分离与鉴定实验指南——RNA 研究方法［译］ (2007 年 11 月)
- 基因表达分析手册［译］
- 蛋白质纯化实验指南［译］
- 核酸分子杂交技术

58.17425073
312

生物实验室系列

RNA 分离与鉴定实验指南
——RNA 研究方法

（原著第三版）

[美] R. E. 法雷尔(Robert E. Farrell, Jr.)编
金由辛　刘建华　金　言　等译

化学工业出版社
生物·医药出版分社
·北京·

中科院植物所图书馆
S0052970

图书在版编目（CIP）数据

RNA 分离与鉴定实验指南——RNA 研究方法/［美］法雷尔（Farrell，R. E.，Jr.）编；金由辛，刘建华，金言等译. —3 版.—北京：化学工业出版社，2007.7

（生物实验室系列）

书名原文：RNA Methodologies：A Laboratory Guide for Isolation and Characterization，3rd edition

ISBN 978-7-5025-9625-5

Ⅰ. R… Ⅱ. ①法…②金…③刘…④金… Ⅲ. 核糖核酸-研究方法 Ⅳ. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2007）第 105375 号

RNA Methodologies：A Laboratory Guide for Isolation and Characterization，3rd edition/by Robert E. Farrell，Jr.

ISBN 0-12-249696-5 978-0-12-249696-7

Authorized simplified Chinese translation edition jointly published by Chemical Industry Press and Elsevier（Singapore）Ltd，3 Killiney Road，#08-01 Winsland House I，Singapore 239519.

981-259-639-9 978-981-259-639-0

Copyright©2007 by Elsevier（Singapore）Pte Ltd.

Copyright©2007 by Chemical Industry Press All rights reserved.

This edition is authorized for sale in China only，excluding Hong Kong SAR and Taiwan. Unauthorized export of this edition is a violation of the Copyright Act. Violation of this Law is subject to Civil and Criminal Penalties.

本书中文简体字翻译版由化学工业出版社与 Elsevier（Singapore）Pte Ltd. 在中国内地合作出版. 本书仅限在中国境内（不包括香港特别行政区及台湾地区）出版及标价销售，未经许可出口，视为违反著作权法，将受法律制裁。

北京市版权局著作权合同登记号：01-2006-3433

责任编辑：傅四周　杨燕玲　　文字编辑：周　倜

责任校对：王素芹　　装帧设计：关　飞

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街 13 号　邮政编码 100011）

印　　刷：北京永鑫印刷有限责任公司

装　　订：三河市延风装订厂

787mm×1092mm　1/16　印张 27¼　字数 658 千字　2008 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686）　售后服务：010-64518899

网　　址：http://www.cip.com.cn

凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定　　价：63.00 元

版权所有　违者必究

参加翻译人员（排名不分先后）

包慧中	陈祥龙	郭立涛	黄　冰	金　言
金由辛	李　洋	李　伟	陆长德	刘建华
刘望夷	秦文明	史　毅	王　剑	姚成果
郑　艳	周立强	赵波涛	邹亚娟	邹永水

谨以此书献给 Catherine Ann、Sean Patrick、

Emma Catherine、Liam Michael 和

Patrick Joseph!

出版者的话

21世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为21世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如17世纪Leeuwenhoek等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973年Cohn和Boyer完成了DNA体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988年Kary Mullis发明的PCR技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及

高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

生物·医药出版分社

译者的话

1998年，中国科学院王应睐院士、王德宝院士、祁国荣教授和我四人建议，由我、北京大学的朱圣庚教授和中山大学屈良鹄教授主持了“面向21世纪的RNA研究”第109次香山会议。在我所做的“20世纪RNA研究成果和21世纪RNA研究展望”的主题报告中，我对21世纪RNA研究前景作了三条预测：第一，以RNA为终产物的基因组计划（RNA组计划）会很快起步；第二，在下述方面会有突破性进展，①新的RNA基因会不断增加，②RNA的新功能会不断被发现，③核蛋白体催化功能的机理的揭示，④核蛋白高级结构的破解，⑤RNA高级结构的计算机模拟；第三，RNA研究将迅速向产业化发展，将进入实际应用阶段。同时我也建议我国开展以RNA为终产物的基因组计划（RNA组计划）等。此后，RNA方面的进展连续5年被美国“Science”评为年度科技十大突破之一。1999年和2000年核糖核酸的催化功能和核糖体使核酶入选。2001年，三个实验室同时发现小分子调控RNA（miRNA）。2001～2003年的3年中，小分子RNA的调控功能、包括siRNA和miRNA在内的小分子RNA入选。“Science”评选出的2004年十大突破中，有一条是，原认为是基因组中垃圾的部分，很可能控制着基因如何被阅读以及控制基因表达的时序和场所。这些垃圾绝大部分都是反转座元件，与RNA有关。2006年诺贝尔生理或医学奖授予美国斯坦福大学医学院的安德鲁·菲尔（Andrew Fire）和麻省理工大学医学院的克雷格·梅洛（Craig Mello），以表彰他们发现了双链RNA引发基因沉默。同年，小分子调控RNA中又添新成员，这些新发现的调控小分子RNA，再次被列入“Science”十大科技突破。至此，8年多后的今天，上述的预言都已变成现实。而尚有大量未知的RNA及其功能等待人们去发现、研究。

曾几何时，当年国内少有人涉足RNA研究，而现在很多人都希望开展RNA研究。我于2005年编著的《核糖核酸与核糖核酸组学》一书（科学出版社，北京），在2006年第2次印刷可以作为一个证据。

核糖核酸生物功能的多样性，特别是它的调控功能，如核糖核酸可以在DNA水平和RNA水平调控遗传信息的改变和阅读，在大范围内调控基因的表达，调控生物分化、发育、细胞周期、凋亡、应激等，正在促进包括医、药、农等涉及生命科学各个分支的人员将RNA技术引进他们自己的研究中。随着大量生物领域的科研人员进入RNA研究领域，现在有很多分子生物学实验手册和RNA实验手册为他们提供各种操作程序。但很多实验者仍然不时会遇到他们难以理解的困难。其原因往往在于，实验者对RNA技术不甚了解，面对多种可供选择的操作程序无所适从。而实验的失败很可能是错用了不合适的程序，或操作不当。RNA操作远比DNA操作困难，原因在于组成RNA的核糖核苷酸比组成DNA的脱氧核糖核苷酸多一个氧原子，它造成RNA的不稳定性。而RNA的完整性是RNA实验成功与否的关键，恰恰是这一点常被某些实验者忽视。Robert E. Farrell, Jr. 所编的“RNA Methodologies”一书，不仅提供了操作程序，更阐明了一些实验要点和注意事项。我想这可能是该书能在12年中出到第3版的原因吧，这也是我们翻译此书的原因。希望此书能帮助我国RNA研究工作者更好地理解RNA技术的内涵，能正确地使用不同的实验程序。希

望此书的出版能促进我国 RNA 研究的开展。

我、我所刘望夷和陆长德两位教授以及上海交通大学刘建华教授四个实验室共 20 人，参与了此书的翻译与校对。刘望夷教授是我的二师兄，从事 RNA 研究已 46 年多。已过古稀之年的他，于 2005 年获得国家自然科学奖二等奖。他那种生命不息、工作不息、对科研工作锲而不舍的精神值得我学习。陆长德教授是与我同年师从王德宝院士学习的师兄，刘建华是我的小师弟。译者邹永水是我所的退休教授，其他大部分参与人员是在学的研究生，他们都有繁重的科研工作，但大家都在不影响本职工作的前提下认真地翻译、校对，这使我非常感动。但我相信，这一工作对他们也是一个很好的学习过程。因为对于进行了 28 年 RNA 研究的我而言，同样感到在翻译此书的过程中收获颇丰。此书翻译过程中，我的夫人包慧中和女儿金言也付出了很多精力，她们都是我的同行。在此，我向所有参与此书翻译的人员表示衷心感谢。

愿我国的 RNA 研究能尽快赶超世界先进水平。也盼望读者对我们可能存在的翻译失误提供宝贵意见。

金由辛
中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
2007 年 2 月 28 日

前　言

为什么要研究RNA？1993年“RNA Methodologies”第1版付印时，就提出了这个问题。分离具有生物活性及化学稳定的RNA，始终是分子生物学的核心问题。尽管这种说法过去未必被人赏识，在今天却显得颇为恰当。但是，本书第2版出版后，很多方面发生了变化。人类基因组计划的完成，预示着以前不为人所知的功能基因组和蛋白质组的出现。现在研究者们经常探讨的都是转录组、蛋白质组、代谢组，还有就是唯恐被我们忘记了的基因组。

很明显，对组织特异性基因表达调控的研究，是个聚集了强烈兴趣的领域，而那些昂贵的印在尼龙滤膜或玻璃芯片上的微阵列测定，又给它加了一把火。但是，不管是这些分析手段，还是基于标准定量PCR之上的测试，都只能建立在从合适的生物材料中分离到高质量RNA这一基础之上。只有高质量的RNA，才能支持反转录或是其他研究其功能的辅助实验。同样在这儿值得一提的是，虽然微阵列技术在当代研究工具中确已占有一席之地，但我们所说的那些“已被仔细检查过的序列”，所指的都是已被克隆的基因。微阵列技术并不能直接支持对以前未被鉴定的基因、不同剪接的转录物或多起始位点的转录物的检测和鉴定。

因此，作为基因表达的一个参数，对RNA的研究在很多实验室仍然是常用的。详细检查mRNA的生物合成，从RNA复杂性的精致控制观点出发，为细胞生物化学提供了一个独特的视角。结合那些传统的实验方法，不同的PCR不断提供不同灵敏度和分辨率的各种方法，以鉴定细胞内的转录活性。mRNA的生物合成、成熟和功能都受到转录及转录后的影响。它们一起构成了无数基因的调控点。因此，RNA的稳定性及其加工过程，在细胞中显然起着中心的调控作用。

按照已有的科学基础规则，对RNA鉴定的方方面面，可以从始至终地组成一个连贯的整体。如何才能从至少一个方面对研究目标的基因表达调控给出较为明确的解释呢，从生物材料中纯化出高质量的RNA，就是其最为基本的起点。虽然与更新、更灵敏的方法相比，很多包括Northern分析在内的传统技术，已经失去了往日的光辉，但是，深思熟虑、应对有度的RNA分离技术，依然与随后的分析和操作具有同等重要的地位。是否能从细胞或组织中分离到RNA，唯有小心翼翼地处理，才能支撑后续的这些技术。

本实验指南不断收录了已经过测试和优化处理的实验室操作程序（实验方案），主要涉及的是真核RNA的分离和鉴定方法，而较少关注对原核转录物的分析。这次第3版中最值得注意的是，新增加了若干如何改进商用RT-PCR的诀窍，改良了的5′RACE、3′RACE、差减PCR方法和优化了的互补DNA（cDNA）合成方法，以及那些富含信息量讨论RNA干扰（RNAi）、微阵列和生物信息学这些新技术的章节。考虑到目前对测定细胞内特定转录物的绝对丰度的空前兴趣，上述这些方法就显得尤为重要。显然，本书聚焦于以RNA为基因表达参数进行的研究，并着重于这些技术的独立运用，或是如何与其他试验相结合，对真核基因表达的转录和转录后调控进行研究。在此，我可以提供的最好的忠告是：在实验时总是多想两步，再想想选用的RNA分离方法是不是会对后面的实验程序和最终的数据解释造成影响。

本书是为独立研究者（译者注：一般指课题组长）、实验科学家、内科医生、兽医师、实验技术员、研究生以及其他任何可能用到基础研究技术的人员编写的。本书有意帮助从新手到熟练的处于各种水平的研究人员，提供在抉择的过程中可遵循的基本原理和切实可行的权宜之策。很多注释和提示都是基于个人的经验，为如何更好地从生物材料，特别是那些富含核糖核酸酶的材料中得到 RNA 而铺路。研究起始时，如果认识不清楚要研究什么和如何进行研究，就会导致 RNA 策略设计上的缺陷，只能日复一日地造成生物材料的浪费。尽管本书不可能全面论及基因表达的所有基本原理，但如何正确操作和试验 RNA，确实是反复出现的主题。本书也清楚地论证了每一种特定技术是如何配合到核酸研究的总体框架中去的。虽然我希望读者能从头到尾研究本书中的内容，但也可以跳跃选择其中的一些实验方案，而不拘泥于其连贯性。对于那些刚开始从 RNA 分析的观点来研究细胞生物化学的读者而言，先读一下第 26 章（一个 RNA 范例）可能会有所帮助。

总而言之，全书的所有章节共同构成 RNA 这个特写。各章都各自提供了一个明确的主题。插入流程图、图表等以促进学习以及帮助研究规划和项目的执行。研究者仅受他们自己灵活性的限制。

我衷心感谢很多给以理性鼓励和各种方式支持本书写作的同事和朋友。对我家庭的支持和耐心也表示公开感谢。

（金由辛译；金言校）

目　录

第 1 章　RNA 与细胞生物学 …… 1
1.1　为什么研究 RNA …… 1
1.2　RNA 是什么 …… 2
1.3　多核苷酸的合成 …… 3
1.4　RNA 的种类 …… 5
1.5　严谨度——影响核酸结构的条件 …… 5
1.5.1　盐对严谨度的影响 …… 6
1.5.2　pH 对严谨度的影响 …… 6
1.5.3　温度对严谨度的影响 …… 7
1.5.4　甲酰胺对严谨度的影响 …… 7
1.6　双链分子的类型 …… 7
1.7　参考文献 …… 8
第 2 章　真核基因的转录与组织 …… 9
2.1　转录和中心法则 …… 9
2.1.1　调控元件 …… 10
2.1.2　DNA 模板 …… 11
2.2　基因组织 …… 11
2.3　RNA 聚合酶和转录产物 …… 13
2.4　参考文献 …… 15
第 3 章　信使 RNA …… 17
3.1　典型 mRNA 分子的拓扑结构 …… 17
3.1.1　5′帽子 …… 17
3.1.2　前导序列 …… 18
3.1.3　编码区 …… 19
3.1.4　尾部序列 …… 19
3.1.5　聚腺苷尾 …… 19
3.1.6　细胞器 mRNA …… 21
3.2　细胞质内的稳定性 …… 21
3.3　调控水平 …… 21
3.4　参考文献 …… 22
第 4 章　核糖核酸酶 …… 26
4.1　基本原理 …… 26
4.2　核糖核酸酶活性的消除 …… 26
4.3　核糖核酸酶抑制剂的种类 …… 27
4.3.1　特异性 RNase 抑制剂 …… 27
4.3.2　非特异性 RNase 抑制剂 …… 28
4.4　器皿和试剂的准备 …… 29
4.4.1　二乙基焦碳酸酯 …… 30
4.4.2　替代方法——用消毒水冲洗 …… 31
4.4.3　过氧化氢 …… 31
4.4.4　氢氧化钠和十二烷基硫酸钠 …… 31
4.5　控制核酸酶活性的其他试剂 …… 32
4.5.1　盐酸胍 …… 32
4.5.2　硫氰酸胍 …… 32
4.5.3　十二烷基硫酸钠 …… 32
4.5.4　*N*-十二烷基肌氨酸钠 …… 32
4.5.5　苯酚∶氯仿∶异戊醇 …… 32
4.5.6　8-羟基喹啉 …… 33
4.5.7　氯化铯 …… 33
4.5.8　三氟乙酸铯 …… 33
4.5.9　蛋白酶 K …… 34
4.5.10　RNAlater（RNA 保护剂） …… 34
4.6　实验方案：氧钒核糖核苷复合物的合成 …… 34
4.7　参考文献 …… 35
第 5 章　RNA 分离策略 …… 37
5.1　基本原理 …… 37
5.2　RNA 纯化的目的 …… 38
5.3　裂解缓冲液的组成 …… 40
5.3.1　温和的裂解缓冲液 …… 40
5.3.2　离液裂解缓冲液 …… 44
5.4　用含有胍离子的缓冲液分离 RNA …… 45
5.5　胍-酸-酚抽提技术 …… 46
5.5.1　实验方案：胍-酸-酚抽提 …… 46
5.6　密度梯度离心 …… 47
5.6.1　氯化铯 …… 47
5.6.2　三氟乙酸铯 …… 50
5.7　同时分离 RNA 和 DNA …… 53
5.7.1　实验方案：同时分离 RNA 和 DNA …… 53
5.8　试剂盒 …… 55
5.8.1　硅胶技术 …… 55
5.9　其他方法 …… 56
5.9.1　实验方案：用十二烷基硫酸钠和乙酸钾试剂快速分离 RNA …… 56
5.9.2　实验方案：原核 RNA 的分离 …… 57

5.9.3 实验方案：酵母 RNA 的分离 …… 58
5.10 纯化 RNA 的短期保存和长期保存 …… 59
5.11 参考文献 …… 60
第 6 章 从组织中提取 RNA …… 62
6.1 基本原理 …… 62
6.2 组织培养或组织 …… 62
6.2.1 细胞培养的优点 …… 63
6.2.2 组织样品的优点 …… 63
6.3 匀浆方法 …… 63
6.3.1 Polytron 破碎 …… 64
6.3.2 杜恩斯匀浆 …… 64
6.4 从不同器官和组织分离 RNA 的方法 …… 65
6.4.1 新鲜组织 …… 65
6.4.2 冷冻组织 …… 66
6.4.3 固定组织 …… 67
6.5 实验方案：用氯化锂-尿素法从组织分离 RNA …… 67
6.6 实验方案：从富含脂类的组织分离 RNA …… 69
6.7 纯化嵌合在多核糖体的 mRNA …… 70
6.7.1 实验方案：嵌入多核糖体的 mRNA 的提取 …… 71
6.8 实地采集生物样品 …… 72
6.9 RNA“净化”方法 …… 73
6.10 参考文献 …… 73
第 7 章 多聚腺苷酸 RNA 的分离 …… 76
7.1 基本原理 …… 76
7.2 多聚腺苷酸化 …… 77
7.3 poly(A) 的解释说明 …… 77
7.4 多聚腺苷酸化 mRNA 的分离 …… 79
7.5 用磁珠技术纯化 poly(A)$^+$ RNA …… 80
7.5.1 实验方案：用磁珠纯化 poly(A)$^+$ RNA …… 81
7.6 oligo(dT)-纤维素柱层析 …… 83
7.6.1 实验方案：生理量的 poly(A)$^+$ RNA 纯化 …… 84
7.7 快速非柱式纯化 poly(A)$^+$ RNA …… 87
7.7.1 实验方案：快速非柱式纯化 poly(A)$^+$ RNA …… 87
7.8 参考文献 …… 88
第 8 章 RNA 制备的质量控制 …… 90
8.1 基本原理 …… 90
8.2 质量控制技术 1：RNA 的电泳检测 …… 90
8.2.1 实验方案 …… 92
8.3 质量控制技术 2：紫外吸收光谱和吸收峰比值 …… 92
8.3.1 核酸浓度和纯度的鉴定 …… 93
8.4 质量控制技术 3：RNA 样品进行 RT-PCR …… 96
8.5 质量控制技术 4：Northern 分析 …… 96
8.6 质量控制技术 5：RNA 样品进行体外翻译 …… 97
8.7 参考文献 …… 97
第 9 章 斑点印迹分析 …… 98
9.1 基本原理 …… 98
9.2 斑点印迹的优点和缺点 …… 99
9.3 合适的阴性对照和阳性对照 …… 100
9.3.1 实验方案：RNA 斑点印迹 …… 100
9.3.2 实验方案：DNA 斑点印迹 …… 101
9.4 斑点印迹数据的局限性 …… 102
9.5 参考文献 …… 103
第 10 章 电泳 …… 104
10.1 基本原理 …… 104
10.2 核酸的标准化 …… 104
10.2.1 实验方案：poly(A) 的标准化 …… 106
10.3 琼脂糖凝胶电泳中 RNA 样品变性方法 …… 108
10.3.1 甲醛变性法 …… 109
10.3.2 实验方案：甲醛变性胶 …… 110
10.3.3 乙二醛/二甲基亚砜变性法 …… 111
10.3.4 实验方案：乙二醛化与 RNA 电泳 …… 112
10.4 分子量标准 …… 113
10.4.1 分子量标准的正确使用 …… 114
10.4.2 核糖体 RNA …… 115
10.5 凝胶染色技术 …… 119
10.5.1 溴化乙锭 …… 119
10.5.2 SYBR 绿 …… 121
10.5.3 SYBR 金 …… 122
10.5.4 GelStar …… 122
10.5.5 银染 …… 122
10.5.6 吖啶橙 …… 123
10.5.7 亚甲基蓝 …… 123
10.6 电泳过程中的安全问题 …… 124

10.7 电泳仪器的维护 …… 124
10.8 第一次进行琼脂糖凝胶电泳时的几点提示 …… 125
10.8.1 基本术语 …… 125
10.8.2 注意事项 …… 125
10.9 参考文献 …… 127
第 11 章 照片文档和图像分析 …… 130
11.1 基本原理 …… 130
11.2 照片文档 …… 130
11.2.1 样本可视化 …… 131
11.2.2 色彩过滤 …… 132
11.2.3 安全第一 …… 133
11.2.4 优化电泳图的一些小技巧 …… 133
11.2.5 照相技术和 X 射线胶片固有的局限性 …… 136
11.3 数字图像分析 …… 136
11.3.1 图像格式 …… 139
11.3.2 实践中需要考虑的问题 …… 139
11.4 参考文献 …… 141
第 12 章 Northern 印迹分析 …… 142
12.1 基本原理 …… 142
12.2 滤膜的选取 …… 142
12.2.1 硝酸纤维素膜 …… 143
12.2.2 尼龙膜 …… 143
12.2.3 聚偏二氟乙烯膜 …… 144
12.3 膜的准备和取用 …… 144
12.4 Northern 转膜技术 …… 145
12.4.1 毛细转膜法 …… 145
12.4.2 涡轮印迹器 …… 146
12.4.3 真空印迹法 …… 146
12.4.4 正压转膜法 …… 146
12.4.5 电转印迹法 …… 146
12.4.6 碱印迹法 …… 147
12.4.7 实验方案：用被动毛细扩散法转移 RNA …… 147
12.4.8 实验方案：用涡轮印迹器向下转移 RNA …… 149
12.5 转膜后膜的处理 …… 150
12.5.1 甲醛变性系统 …… 150
12.5.2 乙二醛变性系统 …… 151
12.6 固定技术 …… 151
12.6.1 烘烤 …… 151
12.6.2 紫外线照射交联 …… 151
12.6.3 实验方案：将 RNA 紫外交联于尼龙膜上 …… 152
12.7 固定后膜的处理 …… 152
12.8 参考文献 …… 153
第 13 章 核酸探针技术 …… 154
13.1 基本原理 …… 154
13.2 探针的分类 …… 155
13.3 标记系统的选择 …… 155
13.3.1 同位素标记 …… 156
13.3.2 非同位素标记 …… 159
13.4 DNA 探针 …… 161
13.4.1 DNA 探针的合成 …… 162
13.5 反义 RNA 探针 …… 164
13.5.1 RNA 探针的特点 …… 166
13.5.2 RNA 探针的合成 …… 166
13.6 探针的纯化 …… 167
13.7 探针的保存 …… 168
13.8 内源参照物 …… 168
13.9 参考文献 …… 170
第 14 章 核酸杂交应用 …… 172
14.1 基本原理 …… 172
14.2 影响杂交动力学和特异性的因素 …… 172
14.2.1 温度 …… 173
14.2.2 离子强度 …… 173
14.2.3 pH …… 174
14.2.4 探针长度 …… 174
14.2.5 探针浓度 …… 174
14.2.6 (G+C) 含量 …… 174
14.2.7 错配 …… 175
14.2.8 探针的复杂性 …… 175
14.2.9 黏性 …… 175
14.2.10 甲酰胺 …… 176
14.3 杂交温度 …… 176
14.3.1 长探针的 T_m 值计算 …… 176
14.3.2 寡核苷酸探针的 T_m 值计算 …… 176
14.4 杂交和 Northern 分析 …… 177
14.4.1 预杂交：滤膜处理 …… 177
14.4.2 实验方案：预杂交（长探针） …… 178
14.4.3 探针变性 …… 178
14.4.4 杂交 …… 179
14.4.5 杂交后严格洗涤 …… 179
14.5 参考文献 …… 179
第 15 章 检测原理 …… 181
15.1 基本原理 …… 181

15.2 放射自显影 …… 182
15.2.1 滤膜的处理 …… 183
15.2.2 X 射线胶片 …… 183
15.2.3 安全灯 …… 184
15.2.4 曝光时间 …… 185
15.2.5 增感屏 …… 185
15.2.6 荧光成像法 …… 186
15.2.7 胶片预闪 …… 186
15.2.8 暗盒的规格 …… 186
15.2.9 显影与定影 …… 187
15.2.10 放射自显影：推荐方案 …… 187
15.3 非同位素方法 …… 188
15.3.1 生物素 …… 189
15.3.2 地高辛 …… 190
15.3.3 荧光标记的核苷酸 …… 190
15.3.4 直接酶标法 …… 191
15.3.5 化学发光检测法 …… 191
15.3.6 显色检测法 …… 193
15.4 数字成像系统 …… 193
15.5 参考文献 …… 194
第 16 章 核酸酶保护法定量测定特定的 mRNA …… 196
16.1 基本原理 …… 196
16.2 基本方法 …… 198
16.3 探针选择 …… 200
16.4 优化建议 …… 202
16.5 可能的困难 …… 203
16.6 实验方案：S1 核酸酶保护分析法定量转录产物 …… 204
16.7 实验方案：RNase 保护分析法定量转录产物 …… 206
16.8 参考文献 …… 208
第 17 章 核 RNA 分析 …… 210
17.1 基本原理 …… 210
17.2 转录速率的检测 …… 210
17.3 实验方案：核逃逸实验（新生 mRNA 分析技术） …… 213
17.3.1 细胞收集及细胞核的制备 …… 213
17.3.2 用 NP-40 缓冲液裂解细胞 …… 214
17.3.3 细胞核制备的备选方案：从组织培养的细胞中分离易损细胞核 …… 214
17.3.4 细胞核制备的备选方案：从完整组织中分离细胞核 …… 215
17.3.5 转录物的标记 …… 216
17.3.6 标记转录物的回收 …… 217
17.3.7 靶 DNA 的制备 …… 218
17.3.8 用于杂交的 RNA 的制备 …… 219
17.3.9 杂交后的洗脱和检测 …… 220
17.4 实验方案：核逃逸实验（备选方法） …… 220
17.5 实验方案：核酸酶保护和脉冲标记转录法 …… 222
17.6 RNA 聚合酶Ⅰ、RNA 聚合酶Ⅱ和 RNA 聚合酶Ⅲ活性的区分 …… 223
17.7 提取用于稳态分析的核 RNA …… 224
17.8 实验方案：直接分离核 RNA …… 225
17.9 实验方案：从富含核糖核酸酶的细胞中制备核 RNA …… 226
17.10 参考文献 …… 227
第 18 章 cDNA 合成 …… 229
18.1 基本原理 …… 229
18.2 cDNA 合成概述 …… 229
18.2.1 第一链合成的注意事项 …… 231
18.2.2 第二链合成的注意事项 …… 235
18.3 核定 cDNA 合成的效率 …… 237
18.4 连接的注意事项 …… 237
18.5 参考文献 …… 238
第 19 章 反转录聚合酶链反应 …… 239
19.1 基本原理 …… 239
19.2 聚合酶链反应概述 …… 239
19.3 反转录聚合酶链反应基本方法 …… 243
19.4 实验室设计 …… 246
19.5 引物设计 …… 246
19.5.1 基本标准 …… 250
19.5.2 T_m 值 …… 251
19.6 优化程序 …… 252
19.7 PCR 产物的分析 …… 256
19.8 RT-PCR 质量监控点 …… 256
19.9 相关技术 …… 258
19.9.1 cDNA 5′末端快速扩增 PCR … 258
19.9.2 cDNA 3′末端快速扩增 PCR … 260
19.9.3 巢式 PCR …… 261
19.10 实验方案：cDNA 第一链的合成 … 261
19.11 实验方案：PCR 反应扩增 cDNA …… 262
19.12 PCR 产物的克隆 …… 263
19.13 实验方案：平末端 PCR 产物的末

端加 A …… 264
19.14 实验方案：TA 克隆的连接反应 … 264
19.15 TOPO 克隆 …… 266
19.16 参考文献 …… 266
第 20 章 定量 PCR 技术 …… 268
20.1 基本原理 …… 268
20.2 灵敏度指标 …… 268
20.3 定量方法 …… 269
20.4 内源参照物 …… 270
20.5 外源参照物 …… 272
20.6 对照反应的规划 …… 273
20.7 关于负对照 …… 276
20.8 竞争 PCR 的关键因素 …… 276
20.9 竞争 PCR 的主要步骤 …… 280
20.10 实验方案：竞争 PCR …… 281
20.10.1 非同源竞争模板的合成 …… 282
20.10.2 第一链 cDNA 的合成 …… 283
20.10.3 竞争 PCR（初级扩增） …… 283
20.10.4 竞争 PCR（次级扩增） …… 285
20.11 关于图像分析的考虑 …… 286
20.12 竞争 PCR 的问题解答 …… 287
20.13 实时 PCR …… 289
20.14 参考文献 …… 292
第 21 章 转录差减法 …… 296
21.1 基本原理 …… 296
21.2 关键问题 …… 297
21.3 差减-校正 PCR …… 298
21.4 非 PCR 差减 …… 302
21.5 差减法的问题与解决办法 …… 303
21.6 参考文献 …… 305
第 22 章 mRNA 差异显示 …… 307
22.1 基本原理 …… 307
22.2 一般过程 …… 307
22.3 产物的多样性：预期得到什么 …… 314
22.4 实验方案：mRNA 差异显示 …… 316
22.4.1 cDNA 的合成 …… 316
22.4.2 通过 PCR 扩增 cDNA 的各个组分 …… 316
22.4.3 PCR 产物分析 …… 317
22.5 实验方案：差异表达序列的鉴定和筛选 …… 319
22.6 用亲和俘获回收差异表达的序列 …… 320
22.7 PCR 产物的克隆 …… 320
22.8 差异表达的验证 …… 321
22.9 进一步的鉴定 …… 321
22.10 差异显示的应用 …… 322
22.11 mRNA 差异显示的问题与解决方法 …… 322
22.12 参考文献 …… 324
第 23 章 基因表达的高通量分析 …… 326
23.1 基本原理 …… 326
23.2 微阵列是什么 …… 326
23.3 微阵列能做什么 …… 327
23.4 微阵列不能做什么 …… 329
23.5 微阵列分析的主要步骤 …… 329
23.6 参比 RNA …… 331
23.7 应用 …… 331
23.8 参考文献 …… 332
第 24 章 RNA 干扰——目标基因的沉默 …… 333
24.1 基本原理 …… 333
24.2 重要的 RNAi 术语 …… 334
24.3 RNAi 是如何工作的 …… 335
24.3.1 siRNA 的导入途径 …… 336
24.3.2 shRNA 的导入方法 …… 337
24.3.3 DNA 指导的 RNAi 技术 …… 338
24.3.4 siRNA 导入哺乳动物细胞的技术 …… 339
24.4 有效的 siRNA 设计 …… 339
24.5 体外和体内的问题 …… 340
24.6 参考文献 …… 342
第 25 章 基因组、转录组、蛋白质组和生物信息学 …… 345
25.1 基本原理 …… 345
25.2 重要术语 …… 346
25.3 基因组与基因组学 …… 346
25.4 转录组与转录组学 …… 347
25.5 蛋白质组与蛋白质组学 …… 348
25.6 生物信息学 …… 349
25.7 参考文献 …… 351
第 26 章 一个 RNA 范例 …… 352
26.1 典型实验 …… 353
26.2 灵敏度的问题 …… 355
26.3 有待进行的 …… 355
26.4 到哪儿去寻求帮助 …… 357
尾声 …… 358
智慧的结晶 …… 358

附录 …… 362
附录 1 保存完整和准确的记录 …… 362
附录 2 储存液 …… 363
附录 3 苯酚的制备 …… 367
附录 4 溴化乙锭和 SYBR 绿溶液的处置 …… 369
附录 5 用 DNase Ⅰ去除 RNA 样品中的 DNA …… 371
附录 6 用 RNase 去除 DNA 样品中的 RNA …… 372
附录 7 甲酰胺、甲醛和乙二醛的去离子化 …… 373
附录 8 硅烷化离心管和玻璃器皿 …… 373
附录 9 分子生物学家的主流工具——离心法 …… 373
附录 10 胰蛋白酶消化贴壁细胞的方法 …… 377
附录 11 用盐析法分离高分子量 DNA …… 378
附录 12 从植物组织中分离 RNA …… 380
附录 13 电泳——原理、参数和安全 …… 380
附录 14 聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 388
附录 15 仪器、试剂和服务的供应商 …… 389
附录 16 SI 词头 …… 393
附录 17 通用缩写 …… 393
附录 18 商标引用 …… 394
术语表 …… 397
索引 …… 409

第 1 章　RNA 与细胞生物学

1.1　为什么研究 RNA

所有细胞和组织的功能，最终都受到基因表达的调控。之所以选择研究 RNA 调控作为细胞生物化学的参数之一，其理由就像细胞内 RNA 群体一样复杂多样。通常，RNA 的性状总是与具体科学研究过程中提出的转录（即基因表达）问题联系在一起。

任何 RNA 实验设计的目标，通常涉及一个或多个功能问题，下面列出了一些这类问题。

① 测定细胞转录物的恒态丰度[1]。因为 RNA 很容易分离，所以恒态丰度是最常被研究的基因表达参数。通过 Northern 杂交、核酸酶保护实验或 PCR 相关方法等测定，可以对 RNA 表达谱进行定性与定量分析。

② 基因序列转录或 RNA 加工途径的速度测定。这个可以用新生 mRNA 分析技术（核逃逸实验）来进行推断，至少可以进行部分推断。新生 mRNA 分析技术就是将放射性同位素标记的核糖核苷酸前体掺入新生转录物，再测定各种 RNA 中掺入同位素的比例。该比例即对应于各种 RNA 的丰度。再结合 Northern 杂交的结果，就能推知对该序列的调控是发生在转录水平还是转录后事件所造成的结果。

③ RNA 分子一级结构的作图，包括 5′末端、3′末端、内含子的大小和位置。以前人们通过核酸酶保护实验（见第 16 章）来完成这项工作，但现在基本上都使用 PCR 的变体，如 cDNA 末端快速扩增（5′RACE 和 3′RACE，见第 19 章）。

④ 在体外无细胞系统对纯化了的 mRNA 进行翻译。这样得到的多肽，可进一步用于免疫沉淀或 Western 杂交分析。体外翻译至少代表了一种对特殊转录物鉴定的方法（由于提供了翻译所需的模板等原材料，因此可以证明某个只是推定了属性的转录物是否能够支持预期序列多肽的合成）。例如，这种方法可以用于证明，来自可变转录起始位点的两个转录物是否来自同一个位点。体外转录在药物设计等应用研究中也是有用的。因为对一个蛋白质的三级结构、野生型或突变型功能的了解可能会对其在功能蛋白质组领域的新应用方面提供一些启示。

⑤ cDNA 的合成。可以以纯化的 mRNA 为模板，利用酶法转化，将相对不稳定的单链分子转变成稳定的单链 cDNA 或双链 cDNA。合成 cDNA 的理由众多，其中之一，就是因为用 PCR 方法可以扩增这些核酸序列。然后，可以做的工作就非常之多，例如，定量或对

[1] 细胞或某个亚细胞组分（如细胞核或细胞质）中最终 RNA 的积累量被称为该 RNA 的恒态量。

转录本作图，直接连接到测序载体或表达载体里，或用来合成整个 cDNA 文库（较正式的名称是克隆库，可通过繁殖来长期保存和分析）。一旦合成了这样一个文库，就对细胞裂解或组织破坏这一瞬间的细胞生化建立了永久的记录。就历史的观点而言，cDNA 合成无疑是分子生物学实验室技术上最重要和最具挑战性的方法之一。

无论是从化学还是生物学的角度而言，RNA 都没有 DNA 稳定，尤其是在较高温度（>65℃）或是碱存在的情况下。除了内在的不利因素之外，多种具有核酸内切活性和核酸外切活性又极易复性能力的核糖核酸酶，不仅对底物明显具有普适性，而且还很难被摧毁。因此，从富含核糖核酸酶的生物材料中制备 RNA 是极具挑战性的。以上因素要求使用未被核糖核酸酶污染的试剂快速回收 RNA。同样，抽提策略还必须考虑，如何应对原本封闭在细胞器或是液泡内，而在抽提过程中被释放出来的胞内核糖核酸酶。对程序中潜在核糖核酸酶污染的大意失察，几乎无一例外地会导致 RNA 降解，以致最终导致样品的报废。至于到底选用哪一种抽提步骤，就需要研究者先考虑“纯化结束后这些 RNA 要拿来做什么”。前几步操作带来的污染即使是痕量的，也会影响到后续反应的效率。并且，由于它们的半衰期天生很短，与 RNA 相关的实验最好就安排在 RNA 纯化的当天进行。

1.2 RNA 是什么

RNA 是一个长长的、无分支的、以磷酸二酯键连接起来的、由核糖核苷单磷酸单元构成的多聚物。原核 RNA 和真核 RNA 均为单链分子。组成 RNA（和 DNA）的基本单元是核苷酸。核苷酸由三个主要部分组成：一个五碳糖（RNA 中是核糖，DNA 中是脱氧核糖）、至少一个磷酸基团和一个碱基（图 1.1）。五碳糖与含氮碱基结合成核苷，再加上一个磷酸基团，就成为核苷酸。

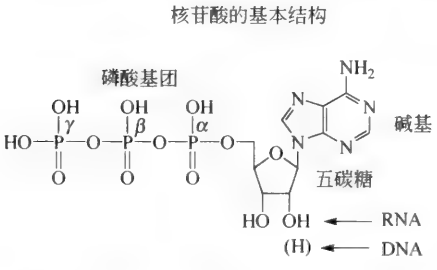


图 1.1 5′-腺苷三磷酸（ATP）。三个组成型磷酸基团 α、β 和 γ，按离核苷（碱基＋糖）的距离，由近到远编码。当 2′-OH 被 H 取代，该分子即成为脱氧核苷酸

RNA 与 DNA 的主要差异是：①核糖 2′位带羟基（—OH），而 DNA 中的五碳糖（脱氧核糖）2′位不带羟基；②RNA 中不含胸腺嘧啶，取而代之的是与胸腺嘧啶很相似的尿嘧啶[1]。RNA 由核苷酸组装而成，DNA 由脱氧核苷酸组装而成。因此，RNA 以其含有核糖而得名，就如 DNA 以其含有 2′-脱氧核苷酸而得名。表 1.1 和表 1.2 列出了它们的基本特征和以组成成分的命名。

表 1.1 核苷酸结构比较

项　目	核糖核苷酸	脱氧核糖核苷酸
主要组成	五碳糖、磷酸基团、含氮碱基	脱氧五碳糖、磷酸基团、含氮碱基
常见的含氮碱基		
嘌呤	腺嘌呤、鸟嘌呤	腺嘌呤、鸟嘌呤
嘧啶	胞嘧啶、尿嘧啶	胞嘧啶、胸腺嘧啶

[1] 就化学命名而言，胸腺嘧啶为甲基尿嘧啶。

表 1.2　基本碱基、核苷、核苷酸的命名

RNA		DNA	
碱　基	核　苷	碱　基	核　苷
腺嘌呤	腺嘌呤核苷	腺嘌呤	腺嘌呤核苷
胞嘧啶	胞嘧啶核苷	胞嘧啶	胞嘧啶核苷
鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷	鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷
尿嘧啶	尿嘧啶核苷	胸腺嘧啶	胸腺嘧啶核苷
核苷酸(核苷三磷酸)			
RNA		DNA	
5′-腺嘌呤核苷三磷酸		5′-脱氧腺嘌呤核苷三磷酸	
5′-胞嘧啶核苷三磷酸		5′-脱氧胞嘧啶核苷三磷酸	
5′-鸟嘌呤核苷三磷酸		5′-脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸	
5′-尿嘧啶核苷三磷酸		5′-脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸	

注：核苷仅由一个碱基和一个五碳糖组成，核苷至少加一个磷酸基团就成为核苷酸。

含氮碱基（图 1.2）和五碳糖均为环形。为区分特定核苷酸的五碳糖或碱基上的碳原子，使用了特殊的编号系统。碱基上的碳和氮原子用 1、2、3 等依次编号，而五碳糖（核糖或脱氧核糖）上的碳原子则用 1′、2′、3′等依次编号。

核苷三磷酸无论作为总体还是单个，都用 NTP 表示。在各种分子生物学实验手册中，NTP 代表等摩尔比混合的 ATP、CTP、GTP 和 UTP。核苷三磷酸前加 d 后则表示脱氧核苷酸，如 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP。在实验手册中，dNTP 表示等摩尔比的四种脱氧核苷酸混合物。上述两类核苷的三磷酸形式，可分别被 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶识别，因此在核酸合成中作为前体。紧靠核糖的磷酸基团为 α-磷酸根，随后依次为 β-磷酸根、γ-磷酸根。γ-磷酸根距离核糖最远（见图 1.1）。核酸合成时，β-磷酸根和 γ-磷酸根被切除，产生的核苷一磷酸则掺入新生的多核苷酸链。

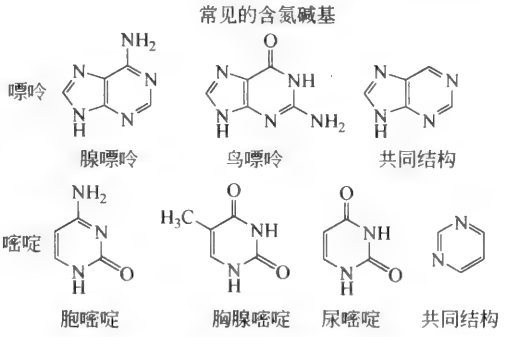


图 1.2　核苷酸以连接在 1′位的碱基种类命名。组成 RNA 和 DNA 的核苷酸用标准的单字符表示，如腺嘌呤（A）、胞嘧啶（C）、鸟嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）

1.3　多核苷酸的合成

RNA 聚合酶负责参与 RNA 的合成（见第 2 章），同样，任何一种 DNA 聚合酶都参与 DNA 的合成。因此，任何具聚合酶活性的酶都能以核苷酸为前体合成核酸分子。核酸分子就是由核苷酸以磷酸二酯键连接成的多核苷酸链。在核酸聚合酶催化下，新生核酸链中最后一个核苷酸的 3′-羟基，亲水攻击新掺入核苷酸的 5′-磷酸根，就形成了磷酸二酯键。

假设细胞内的生物化学反应能支持 RNA 分子的起始和延伸，则在体内（和体外）必须维持如下两个基本条件。

① 必须存在一个模板链，可以指导核苷酸以反向互补的方式正确掺入新生的核酸链。

配对方式必须符合夏格夫法则，即 A ∶∶ U 或 A ∶∶ T 通过两对氢键配对，G ∶∶∶ C 以三对氢键配对。

② 起始和延伸时，必须存在一个游离的核苷酸 3′-OH，它可以与下一个核苷酸以磷酸二酯键连接。因此体内或体外的转录过程均需要引物提供游离的 3′-OH。DNA 合成也需要引物[1]。分子克隆中所使用的大多数聚合酶都需要模板和引物的 3′-OH。

多核苷酸的延伸涉及核苷单磷酸的掺入，而磷酸二酯键的形成伴随着焦磷酸的释放。无论是 RNA 还是 DNA 合成，都是从 5′向 3′延伸合成多核苷酸。在相邻的核苷酸间保持统一的 5′→3′连接。延伸常被归因于聚合酶 5′向 3′的延伸活性。

核酸分子的组装方式如下。

① 分子的两个末端结构截然不同。分子的第一个核苷酸带有未参与反应的 5′-(三) 磷酸，构成了所谓的 5′末端[2]。最后加上去的核苷酸所带的 3′-OH，被称为分子的 3′末端。

② 分子骨架又称磷酸二酯键骨架，由交替排列的五碳糖和磷酸基团组成。由于磷酸根的原因，致使分子带负电。

③ 碱基突出在骨架外部。从立体化学角度看，骨架上伸出的碱基很容易与互补的多核苷酸序列形成氢键（碱基对）。这是分子杂交的核心，当然双链也就是如此形成的。

含氮碱基分属嘌呤（腺嘌呤和鸟嘌呤）和嘧啶（胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶）。它们都是扁平的芳香类分子（见图 1.2）。嘌呤与嘧啶间的碱基对，主要由腺嘌呤和胞嘧啶的氨基（不偏好亚氨基）及鸟嘌呤和胸腺嘧啶或尿嘧啶的酮基（不偏好烯醇基）维系。当具有亲电性的氢原子被具亲核性的原子如氧或氮吸引，互补碱基间的氢键就形成了。这些氢键都是高度方向性的。由于碱基从各自磷酸二酯键骨架上突出，这种方式更有利于碱基对或互补链间的杂交以反平行方式形成。因此，碱基配对的两条链中，一条链的 5′末端与其互补链的 3′末端形成碱基对（图 1.3）。

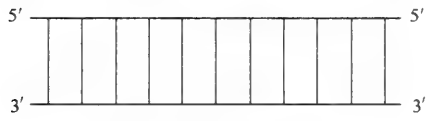


图 1.3　碱基配对

基于分子 5′末端和 3′末端明显的结构差异形成了这样一种惯例，可以很明确地指出具有任何拓扑性质的核酸分子的位置：

上游——相对其他位置靠近或处于分子 5′方向的结构或特性。

下游——相对其他位置靠近或处于分子 3′方向的结构或特性。

出于简洁的要求，上游和下游可以相应地用来表示“和表达的方向相反”与“和表达的方向一致”。在描述双链分子的显著特征，例如讨论基因的表达或是设计 PCR 引物时，这种命名法显得特别有利。

多核苷酸的具体碱基序列被称为 RNA 的一级结构。单个 RNA 分子高度倾向于形成分子内碱基配对，这又被称作二级结构。分子内几种可能的相互作用有诸多的命名，如 RNA 发夹结构、茎、内部环（interior loop）、突环（bulge loop）、多枝环（multibranched loop）和假结。更高层次的三维折叠（也被称作三级结构）是对二级结构元件集合的最好的描述，这种结构是 RNA 分子行使生物功能所必需的。tRNA 是极好的分子内碱基配对案例，对

[1] 唯一不需要模板信息就能添加核苷酸的 DNA 聚合酶，就是末端脱氧核苷酸转移酶，也称末端转移酶。此酶已被广泛应用于 cDNA 的合成以及某些形式的 5′RACE。将在第 18 章和第 19 章内讨论这些特例。

[2] 真核生物 mRNA 5′末端带特征性的帽式结构。详情见第 3 章。

tRNA 的详细研究，解释了很多折叠结构的作用。很大程度上，许多 RNA 的二级结构和三级结构，都可能对非标准碱基配对的形成有贡献[1]。大多数实验室操作中，常常需要在实验前破坏 RNA 的高级结构，否则对 RNA 相关的实验会造成严重的负面影响，这在后文中会再讨论到。

1.4　RNA 的种类

通常把转录所得的 RNA 分子称为转录物。细胞内的转录物有核糖体 RNA（rRNA）、转移 RNA（tRNA）、核不均一 RNA（hnRNA）、信使 RNA（mRNA）以及其他 RNA。不同的 RNA 由不同的 RNA 聚合酶合成，并在细胞中行使不同的功能。这些种类繁多的 RNA 群体在细胞中的丰度并不相同。各种 RNA 的丰度直接与细胞生化状态有关。

rRNA 是所有转录物中丰度最高的品种。原核细胞中主要的 rRNA 品种是 23S rRNA、16S rRNA 和 5S rRNA。真核生物中主要是 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 和第四种核糖体转录物 5.8S rRNA。这些分子组成了核糖体的脚手架。当它们与约 70 种蛋白质结合后，核糖体就具有了蛋白质翻译活性。任何时间里并非所有的核糖体都是有功能的。短暂的无活性核糖体库的存在，其本身就是基因表达的调控器。rRNA 的超高丰度常使它成为电泳的上样对照和外加的分子标记（见第 10 章）。

tRNA 承担将氨基酸带入核糖体，以供从无到有的蛋白质合成。tRNA 携带氨基酸，长度小于 100 碱基，主要在 74～95 碱基长度的区间。当 tRNA 以其 3′末端共价连接方式携带氨基酸时，它被称为氨酰化的 tRNA。在 mRNA 的编码区（见第 3 章），每组 3 个核苷酸组成一个密码子。依赖于 tRNA 中被称为反密码子的三核苷酸，通过互补方式识别 mRNA，使正确的氨基酸进入新生的多肽链。核糖体上 tRNA 反密码子与密码子间的碱基对，支持了蛋白质的延伸（见 Lewin 的综述，2004）。tRNA 的组成中，还有一些修饰碱基，如假尿嘧啶（Ψ），它的存在促进了非标准碱基配对的形成，如包括 A-Ψ、G-U 和 G-Ψ。虽然 tRNA 的丰度不如 rRNA 的高，但是小分子的 tRNA 在翻译中起中心作用。

mRNA 是所有转录物中最不均一的 RNA。具讽刺意义的是，尽管 mRNA 的丰度很低，但它起着决定细胞表型的作用。mRNA 通过利用由大量 rRNA 和 tRNA 组成的翻译装置，单独指导蛋白质的合成。细胞中不同 mRNA 之间，它们各自的数量和丰度变化很大。有些 mRNA 一个细胞里有数百个拷贝，而另一些 mRNA 一个细胞中仅几个拷贝。真核细胞中有功能的 mRNA 来自于经过剪接和修饰的核不均一 RNA（hnRNA），它也是分子生物学家最感兴趣的 RNA。

1.5　严谨度——影响核酸结构的条件

一个双链核酸分子中的两个单链实际处于动态变化中。在实验室里一些变化，如两个单链核酸分子在其互补碱基间形成稳定氢键的能力，是可以被操作的。在实验室里，研究人员应该具有促进或阻止双链分子形成的能力。研究人员也经常需要在一个实验中，使一个分子在单链形式和双链形式间变化。分子生物学家已经接受了一个术语“严谨度”，以描述给定

[1] 标准碱基配对：G-C 和 A-U；非标准碱基配对：A-C，G-U，U-U，G-G，A-Ψ，G-Ψ，A-A-U 和其他。

的一套条件。这些条件被用来正确操作多核苷酸的状态。严谨度是一种可能性测定，即双链核酸分子解聚成组成它的单链的可能性。严谨度也是一种单链核酸分子的能力测定，即区分哪些分子间能高度互补，哪些分子间较少互补。因此严谨度是互补核酸分子在可能被认为相当对立条件下的行为总和。实践中高严谨度的条件，仅仅有利于高度同源的核酸分子间或者所谓的精确配对序列间的稳定杂交。如果一个系统中严谨度下降，则非特异杂交成比例地增加，即意味着“错配”是可以容忍的。

可以促进或阻止核酸杂交的体外操作因素，包括 pH、离子强度、温度和甲酰胺（表 1.3）。应该认清的两个重要事实是：其一，这些外在变量实际上行使的是相当于时间一样的功能；其二，由双链到单链或单链到双链，并不是一个在瞬间就可以完成的转换。核酸的内在质量和分子长度（组成核苷酸的数目）以及两个单链分子的互补程度，所有这些都影响双链在任何给定严谨度下的稳定性。事实上，对这些变量进行的操作就是微调核酸分子在高度互补和低度互补状态间改变的能力。

表 1.3　影响核酸结构的因素

低严谨度	高严谨度	低严谨度	高严谨度
高盐 微酸性 pH	低盐 碱性 pH	低温	高温

注：低严谨度环境促进了双链分子的形成；而随着严谨度的增加，双链分子更倾向于解聚成单链。加入甲酰胺有助于在较低温度下维持高严谨度。

试图用改变温度的方法来获得一个高严谨度的环境，需要将温度提高到危及 RNA 或 DNA 分子化学稳定性的温度。为了排除这一潜在的严重问题，甲酰胺这种有机溶剂常被用于构建较低温度下的高严谨度，这样就不大可能危及核酸分子的完整性。甲酰胺主要是通过干扰氢键形成而降低碱基配对分子的解链温度（T_m）。双链分子的 T_m 被认为是最好的平衡点，也即在这个温度下，有 50%的双链分子解聚成为单链。高严谨度杂交通常在略低于计算预测的 T_m 温度下进行，以保证杂交的完全。加入甲酰胺有效降低了进行高严谨度杂交所需要的温度，因此给研究者对实验参数的选择带来了更大的自由度。

为了调节严谨度而加入甲酰胺，可能使得状态复杂化；另外，也存在其他可以起相同作用的简单方法，如提高或降低盐浓度，增加或降低系统温度。在核酸混合物中，低严谨度条件有利于或促进双链形成，而高严谨度条件则有利于或促进单链的形成。以下讨论每个与严谨度相关的变量的精确贡献。更多细节详见第 14 章。

1.5.1　盐对严谨度的影响

生理状态下的离子强度处在 10～20mmol/L 之间。在实验系统中，由于核酸链带负电，天然的静电排斥会阻止互补链之间碱基对的形成，而单价阳离子在或低或高的浓度下可以中和这一静电排斥。最常被用作抗衡离子的单价阳离子有 Na^+、K^+、Li^+，它们使两条带负电的磷酸二酯键骨架间的静电排斥变小。在低浓度盐或无盐条件下，静电排斥得到加强，结果有利于双链分子的解聚。在细胞内，带阳离子的蛋白质至少部分中和了核酸的负电，因此阻止了不正确的链变性。

1.5.2　pH 对严谨度的影响

pH 会影响核酸分子的离子化程度。在近中性的生理 pH 条件下，核酸处于一定程度的

离子化状态。虽然此时的多核苷酸分子带负电，但在互补的多核苷酸之间仍然可以发生杂交。而在稍低于生理 pH 的条件下，偏酸的环境将导致核酸，特别是双链核酸（dsDNA）发生固缩。但是，体外低于 pH5 的酸性环境就非常危险，因为脱嘌呤反应（即降解）将快速发生。高于生理 pH 的偏碱性环境，会增加磷酸基团的解离，静电排斥力超过双链分子的热动力学稳定性，结果造成链的解聚。虽然实验室广泛使用 NaOH 来变性 DNA，但进行 RNA 实验时，切记 RNA 分子对于碱水解是极其敏感的。不要将 RNA 暴露在强碱环境（pH＞8.6）下，除非想破坏它。

1.5.3　温度对严谨度的影响

通常温度的作用与盐浓度的作用相反。双链的热动力稳定性不仅与核苷酸长度有关，也与鸟嘌呤和胞嘧啶（G＋C）的含量有关，因为在鸟嘌呤与胞嘧啶之间有 3 个氢键，而在腺嘌呤和尿嘧啶之间或腺嘌呤和胸腺嘧啶之间只有 2 个氢键。系统加热超过双链的 T_m 值时，双链就很容易发生解聚。并且，越短的核酸分子对温度的升高越敏感。任何一位分子生物学家都可以为下述事实作证：小小的 1℃的变化，就可以轻易影响到寡核苷酸的工作性能。寡核苷酸杂交探针和 PCR 引物工作还是不工作，仅仅就因为在计算热动力学参数时犯下的 1℃之差。关于杂交和杂交后洗涤的精确实验条件可参见第 14 章，用作 PCR 引物的寡核苷酸将在第 19 章讨论。

1.5.4　甲酰胺对严谨度的影响

双链分子的 T_m 值主要决定于碱基对的数量和（G＋C）含量，特别是对于不到 100 碱基对的分子更是如此。在这样的系统中，双链分子的热稳定性对系统温度极其敏感。因此，对于长探针可能需要非常高的温度才能维持相应的严谨度。通常计算得出的杂交温度（在第 14 章讨论）在任何环境中都远高于允许碱基对形成的温度。在这种情况下，实验者可以选择添加甲酰胺来达到降低 T_m 值后，依然维持高严谨度的目的。其净结果，就是在高严谨度环境中，可以使用低得足以允许碱基对形成的温度。这既保证了杂交的高忠实性，又排除了极端温度。一般而言，每增加 1%的甲酰胺，可以使 T_m 值下降 0.75℃。

1.6　双链分子的类型

除了重组 DNA 方法学是一种酶学技术之外，另一个事实就是杂交技术是分子生物学家主要工具之一。这里所说的杂交技术，是指促使两个互补单链核酸分子形成双链分子的方法。在体外系统中，这项技术允许从混合的 DNA 或 RNA 分子中鉴定并回收特异的分子——这也是 PCR 技术的关键核心。在这种情况下，下列术语是同义词，并且常常可以互换使用：

杂交

碱基配对

双链形成

退火

要明确认识到“双链分子的形成仅仅是碱基的功能，与多核糖核苷酸和多脱氧核糖核苷酸分子的骨架毫不相干”是非常重要的。正因为如此，分子生物学家可以使任意两条互补的

多核苷酸链形成表 1.4 中各种类型的双链。

表 1.4 各种类型的双链

分子类型	符　号	分子类型	符　号
双链 DNA DNA：RNA 杂合物	dsDNA，DNA：DNA DNA：RNA	双链 RNA	RNA：RNA

就热动力学而言，dsDNA 是上述三种类型中最不稳定的，DNA：RNA 杂合物要相对稳定一些，而最稳定的是由两条互补 RNA 所形成的杂合物。在体内系统中，尽管原先认为 RNA 分子主要以单链形式存在，但事实上 RNA 分子中广泛存在很多分子内的碱基配对。就实验操作而言，形成了双链 RNA 分子即允许非常严谨的杂交和洗涤条件。基于这一理由，选择 RNA 探针作为提高实验信噪比的方法也是可取的。

1.7 参考文献

Lewin, B. (Ed.). (2004). "Genes VIII." Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, J. (Eds.). (2004). "Molecular Cell Biology," 5th ed. W. H. Freeman and Co., New York.

Malacinski, G. M. (2003). "Essentials of Molecular Biology," 4th ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Weaver, R. F. (2002). "Molecular Biology," 2nd ed. McGraw Hill Publishers, New York.

Zamenhof, S., Brawermann, G., and Chargaff, E. (1952). On the desoxypentose nucleic acids from several organisms. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 402–405.

（金由辛译；金言校）

第 2 章　真核基因的转录与组织

2.1　转录和中心法则

根据分子生物学中心法则[1]，遗传信息流从基因组序列（DNA），通过信使 RNA(mRNA)中介，最后到以功能多肽形成的表型（图 2.1）。该法则适用于原核细胞和真核细胞。自然界已观察到一些不符合中心法则的现象：①伴随反转录病毒反转录酶的发现（依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶），病毒基因组 RNA 通过双链 DNA 中介而复制，其目的是将病毒的序列整合到宿主的基因组中（溶源）或进行病毒后裔的活性生产（裂解途径）；②RNA 编辑的发现（Benne 等，1986；Chan 和 Nishikura，综述，1997），以 RNA 序列的可变而闻名，转录序列被改变了。

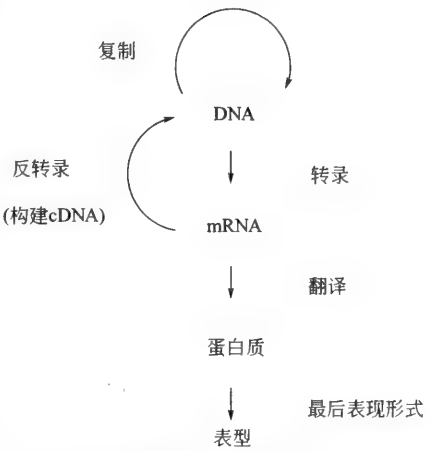


图 2.1　分子生物学中心法则。转录过程产生 mRNA，翻译过程产生蛋白质。复制，即 DNA 被倍增的过程，发生在真核细胞周期的 S 期。互补 DNA 在体外被用来测定转录活性

一个半世纪之前，生活在 Brno（当时属于奥地利）的罗马天主教牧师孟德尔，提出了基因的概念。基于他用豌豆进行多次遗传杂交的结果，孟德尔知道，一种他称为的“因子”，从一个世代传到另一世代。但是这些因子的性质当时是完全未知的，可能更不清楚这些因子表达的机理。特别是在近 50 年里，在遗传物质的性质、细胞遗传物质的组织及基因表达和调控方面，已经看到不平行的科学调查和发现。

转录是从双链 DNA 的特定序列（位点）合成单链 RNA 分子的过程，这是被称为 RNA 生物合成的几个步骤中的第一步。转录发生在真核细胞的核内（或线粒体、叶绿体）以及原核细胞共有的细胞间隔区。转录的所有时相都是易变的，并且可能是基因表达调控的潜在控制点。因此一个转录单位是一段 DNA 序列，它包括适当的转录起始和终止信号，并支持初始 RNA 转录本的合成。转录过程的命名是因为信息以相同的语言（核酸语言）从 DNA 转移到 RNA。相反，翻译过程的命名是因为核酸以 mRNA 形式指导从氨基酸前体装配初始多肽，核酸指导用蛋白质的语言执行。核糖体是所有细胞多肽合成的细胞器；真核蛋白还需经修饰、分拣、包装并通过高尔基体到它们正确的亚细胞

[1] 由克里克于 1957 年在实验生物学学会的讨论会上提出。

位置。

2.1.1 调控元件

转录由 RNA 聚合酶催化。这些酶识别位于庞大而复杂的基因组 DNA 中非常特别而保守的启动子或起始序列。启动子与基因的结构部分结合在一起（图 2.2），并有几个可识别的核苷酸模块。这些序列通常也被称为共有序列。这一术语通常用来表示在一特殊部位的核苷酸序列模式。这些调控元件的序列和精确的几何构象可以促进或阻止转录的进行，并可以各种不同的效率工作。启动子元件位于转录起始位点（transcription start site，TSS）的 5′侧或上游，用与转录起始位点的实际核苷酸距离前加符号“－”表示。第一个转录的核苷酸被定义为“＋1”，位于转录起始位点 3′侧或下游的任何其他位点，用实际核苷酸距离前加符号“＋”表示。启动子共有序列的知识主要来自标准 DNA 克隆技术、点突变、DNA 测序等大量实验结果。

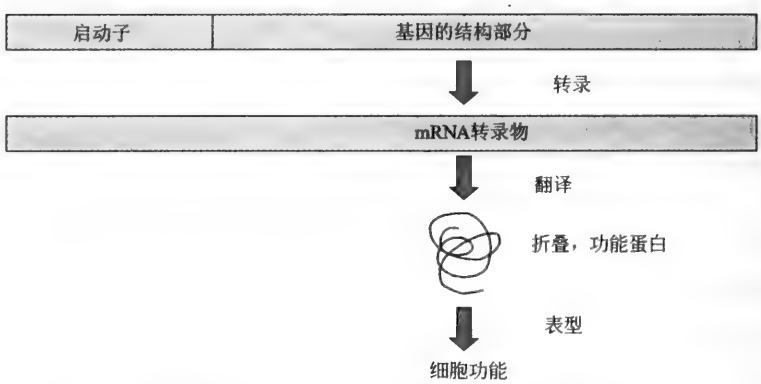


图 2.2 基因编码蛋白质的信使 RNA（mRNA）直接处于称为启动子的调控元件控制之下

原核系统中，启动子元件包括－10 序列，即由 TATAAT 共有序列组成的 Pribnow 盒。另一保守区位于上游，被称为－35 序列（TTGACA）。在某些物种中，在更上游处有一富含 AT 的结构域。已知－10 序列与－35 序列间的距离是很严格的。该距离的变化会减弱 RNA 聚合酶与启动子的相互作用。

相应地，真核启动子是 TATA 盒，以前称为 Hogness 盒，命名的原因是它含腺嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸。一段时间，人们认为所有真核启动子都表现为 TATA 盒。但事实并非如此。实际上是缺乏 TATA 盒的启动子具有称为下游启动子的元件（downstream promoter element，DPE）。它大约位于转录起始位点下游＋30 碱基处（＋30）。除了 TATA 或 DPE 外，另一个启动子模块是 CAAT 盒，某些基因，但不是所有基因有此元件，它的命名是因为序列的保守性。TATA 盒处于－30 区，CAAT 盒位于－75 区，CAAT 盒位于更上游，活性也很强。这些元件控制 RNA 聚合酶的起始结合，并选择转录起始位点。第三个常见的启动子元件是 G 盒或 GC 盒［$(GGGCGG)_n$］。GC 盒位于启动子区的－90 区和－120 区，有一个或多个拷贝。另一个短的八核苷酸元件 ATGCAAAT 和它的反向互补序列 ATTTGCAT，是启动子耦联序列，它影响 RNA 聚合酶Ⅱ的转录效率。这些因子起转录结合因子和转录起始功能。有趣的是所有启动子中没有一个统一的组分和组织。启动子的特殊排列组合和它们之间的距离是识别转录起始调控元件的依据。简

而言之，与原核细胞转录比较，真核转录起始需要多种转录因子与顺式元件结合，这些元件组成了启动子。

真核启动子并非单独工作，很多真核细胞转录受增强子序列的显著影响。增强子的作用显然是促进了转录起始。各基因间增强子序列对应于启动子的精确位置和方向各不相同。某些基因组序列（如免疫球蛋白基因），甚至在基因的结构部分有增强子。通常除去增强子序列可降低转录效率。在基因中加入非天然的增强子序列也可以极大地增加转录效率。通常增强子无方向性，并且位于 TSS 几百个核苷酸以外（如果不说是在几千个核苷酸以外的话）。在体内，转位导致的启动子与基因接近，可以造成不正确的基因表达，通常可能是灾难性的结果。上游和下游增强子序列对启动子的影响已被充分证明，而其作用机理尚不清楚。

2.1.2　DNA 模板

转录过程中，被转录基因的两条链有不同的名字和不同的任务。实际起 RNA 聚合模板作用的链称为模板链，另一条不起模板作用的链称为编码链[1]。发表基因序列时，通常发表编码链的序列，从 5′写到 3′，从左写到右。其含义是模板链 3′→5′，反向平行于编码链。模板链的命名是因为核苷酸插入新生转录本的精确顺序是由模板链决定的。新生转录物与模板链核苷酸序列互补。认识这一点是重要的，随启动子序列的位置改变，编码链和模板链的任务可能改变。这种现象的典型例子是在两个不同启动子间体外克隆一双链 DNA，通常是噬菌体聚合酶启动子 SP6、T3 或 T7。这种克隆的构建常被用于大量体外转录正义 RNA 和反义 RNA，用作核酸探针（见第 13 章）。

2.2　基因组织

为了理解转录产物的意义，首先需要了解基因的组织。典型的原核基因组像一个小的外包装，通常编码处于同一代谢途径的多种蛋白质基因，以操纵子形式成簇聚在一起（Jacob 和 Monod，1961）。*lac* 操纵子，它的基因产物参与作为碳源的乳糖代谢，就是一个极好的例子。其 RNA 分子从一个操纵子（通常是多顺反子，即单一的 RNA 转录物编码多个多肽）转录得到。在一个多顺反子 mRNA 中，每个多肽的编码信息是连在一起的，即在编码序列中没有其他的或非编码的信息隔断。这样的方式对于单细胞生物来说，可以达到能源利用效率的最大化。

事实上，原核基因表达的动力学是如此之快，以至于细菌的 mRNA 被转录、翻译和降解几乎是同时进行的。过去，这种固有的性质使克隆原核 mRNA 的想法不能实现。在从革兰阴性菌和革兰阳性菌中分离有用的 RNA 方面，虽然现在已经取得巨大的进步，这些创新成果已经以试剂盒的形式提供使用，但原核 RNA 的分离有时仍然是挑战。

与原核系统相反，几乎所有的真核 mRNA 都是单顺反子。虽然单个的多肽是从特定的单顺反子 mRNA 分子翻译而来，但相同的 mRNA 可以被重复翻译，只要转录本仍然具有生

[1] 编码链也被某些人称为正义链，模板链被称为反义链。

物与化学活性。为了发挥翻译最大化的潜力，mRNA 转录本常常同时与多个核糖体结合，单个的转录本被依次翻译。这种一个 mRNA 与多个核糖体的结合，称为多核糖体。这种结构在原核系统与真核系统中都能看到。任何给定时间，细胞全部结合了多核糖体的 mRNA 称为多核糖体组分。多核糖体组分的鉴定，可以用来评估细胞在限定实验条件下的翻译活性。简单讲，大量的多肽分子可以从单个 mRNA 分子制造出来。

仔细检查真核基因后发现，绝大多数基因比直接对应于指导多肽合成所必需的部分要大得多。也就是说这种氨基酸序列与 DNA 序列在基因位点内并不一一对应。这种大小差异也可以在成熟胞质 mRNA 水平观察到。mRNA 通常比编码它的 DNA 序列短得多。进一步审查，这种矛盾可以在基因组织水平加以解释，基因序列可分为如下两类。

① 外显子是对应于成熟胞质 mRNA 的 DNA 区段。外显子可以有也可以没有编码多肽的功能。

② 内含子是被转录，但一般不存在于对应 mRNA 中的 DNA 区段。外显子被有系统地从 RNA 初始转录本中剪接除去，从而使邻近内含子的外显子序列连接起来。虽然内含子通常不指导多肽合成，但某些真菌线粒体 RNA 可能是个例外（见 Tereba，1985；Cech 和 Bass，1986 的综述）。

基因外显子和内含子的数量和长度取决于其基因位点，并且是高度可变的。对每个位点的这种变量，在进化过程中是高度保守的。与长度可达几千个碱基对的内含子相比，外显子往往较短，对于大多数生物，每个外显子编码少于 100 个氨基酸。在很多例子中，基因的一个或多个外显子的保守序列，可被用来分离其他生物的相关基因。在内含子序列中未发现有显著的同源性。并且内含子的所有阅读框中，常有多个终止密码子。这并非完全出乎预料，因为内含子的非编码功能有利于突变的积累。这些突变如果发生在外显子序列中，可能是致命的。在某些特殊例子中，如人 β-干扰素完全缺失内含子序列（Tavernier 等，1981）。但是检查内含子剪接的连接处时，发现在内含子中含有严格保守的二核苷酸共有序列（Breathnach 和 Chambon，1981；Mount，1982）。在内含子的 5′侧发现以 GU 开始，以 AG 结束[1]；相信在高等真核生物中，这种现象达 100%。

直接邻近内含子边界二核苷酸的核苷酸同样是保守的（65%～75%）。并且在剪接位点的一个点突变，可以造成该位点的失活。这种现象是基于辨别外显子序列的方法，称为外显子捕获（Duyk 等，1990）。一个推测的含外显子的序列被克隆进一个特殊的载体，载体由一个内含子在两侧各加上一个已知的外显子组成。克隆 DNA 中的一个外显子，当它与载体中内含子连接，将得到更长的转录物，可以用 Northern 分析检查此转录物。某些例子中，剪接位点的突变可以利用另一个剪接位点产生异常的 mRNA。新的剪接位点通常在内含子中（Triesman 等，1982），一个例子就是 β-地中海贫血的个体。这种外显子被内含子打断的基因组织，可能在所有较高等的真核生物中都是常见的，但这种现象不适合于线粒体或叶绿体位点，也不适合于酵母 tRNA 基因（Lewin，2004）。

内含子除去（剪接）的实际机制，部分由高度保守的小 RNA 家族介导。这些分子以

[1] 所谓的描述外显子-内含子剪接位点的 AG-GT 规则，参见 DNA 合成。初始转录物内含子 5′末端被证明是 GU。

RNA-蛋白质复合物形式存在，名为 U1、U2、U4、U5 和 U6，它们定位于核内，一般以小核核糖核蛋白体（snRNP 或 snurps）被提及。Hamm 和 Mattaj（1990）首先描述了有效鉴定这些必要的剪接因子的方法学。在真核生物的细胞质中，发现有类似的高丰度小胞质 RNA（scRNA 或 scyrps）。与 snRNA 一样，已知 scRNA 分子存在于 RNA-蛋白质复合物中。scRNA 分子在调控蛋白质合成、蛋白质分拣和可能的 mRNA 降解中的作用，是一个很有兴趣的领域。另一类核仁小分子 RNA（snoRNA）与核糖体 RNA（rRNA）的生物合成相关联（Kass 等，1990）。某些内含子的切除也可通过 RNA 自剪切发生。催化 RNA 的酶一般被称为核酶，由 Cech 等（1981）首先描述。大量使人着迷的有关 RNA 生物学的信息，在其他地方也有描述（综述：Michel 和 Ferrat，1995；Wilson 和 Szostak，1999；Kurreck，2003；Lewin，2004）。

转录的直接产物是 RNA 分子，它的序列与来自的 DNA 序列精确相关。这些初始转录物仅是功能 RNA 的前体，并且处于真核细胞的核内。在核内，前体 RNA 名为核不均一 RNA（hnRNA）。hnRNA 与特定的核蛋白形成核不均一核糖核蛋白体（hnRNP），即一种核内丰度很高的组分（综述：Dreyfuss 等，2002）。如前所述，因为 mRNA 形成并作为它编码蛋白质的模板功能，内含子必须首先被除去。产生的外显子序列串，仅是 RNA 成熟之路中几步修饰中的一步。这种前体的加工，以及随后的几步都发生在核内。只有经过全部加工的转录物，才被输出到细胞质，作为成熟 mRNA 分子发挥功能。切除的内含子序列保留在核内，并被降解。

2.3　RNA 聚合酶和转录产物

转录基因的酶称为 RNA 聚合酶，其产生的 RNA 主要是 rRNA、tRNA 和 mRNA，还有所有稀有的 RNA。真核基因由三种 RNA 聚合酶中的一种催化。这些酶属于最大和最复杂的蛋白质，与相应的原核 RNA 聚合酶相比，它们由更多的亚基组成。真核 RNA 聚合酶有 RNA 聚合酶Ⅰ、RNA 聚合酶Ⅱ和 RNA 聚合酶Ⅲ。每一种酶都负责不同类型基因的转录（见表 2.1）。相反，原核细胞只有一种 RNA 聚合酶，它转录所有三类主要的 RNA。RNA 聚合酶只有在存在 DNA 时才有活性。它需要 ATP、CTP、GTP 和 UTP 核苷酸作为前体，同时需要 Mg^{2+} 作为辅助因子。三类真核 RNA 聚合酶的转录产物，可以用它们对二环八肽的真菌毒素（α-鹅膏蕈碱[1]）的不同敏感性来区分（Roeder，1976；Marzluff 和 Huang，1984）。其应用见第 17 章。

表 2.1　真核 RNA 聚合酶及其产物和对 α-鹅膏蕈碱的敏感性

真核 RNA 聚合酶	产　物	对 α-鹅膏蕈碱的敏感性
RNA 聚合酶Ⅰ	rRNA(28S,18S,5.8S)	—
RNA 聚合酶Ⅱ	pre-mRNA→→→mRNA	++++
RNA 聚合酶Ⅲ	tRNA,5S rRNA,snRNA	+

注：mRNA—信使 RNA；rRNA—核糖体 RNA；snRNA—核小分子 RNA；tRNA—转移 RNA。

所有 RNA 的转录都是 5′→3′方向聚合。转录包括三个不同的时相：起始、延伸和终

[1] 来自毒蘑菇 *Amanita phalloides*。

止。其他书籍对这些过程均有详细描述。简要地说，起始包括 RNA 聚合酶借助于起始因子的帮助，与 DNA 模板的启动子结合，随后 RNA 分子的第一个核苷酸进入。延伸包括核苷酸掺入新生链，延伸蛋白因子也参与此过程。终止是 RNA 合成的完成，不管产物是否正确或提早成熟，新合成的 RNA 和 RNA 聚合酶都要从模板上解聚下来。终止与起始和延伸一样，也受到小蛋白质（终止因子）的影响。尽管有突变，但合成的 RNA 分子必须与编码链的 DNA 序列一致。对于真核细胞，转录产物的命运在第 3 章有阐述。

真核细胞里，编码 rRNA 基因的转录由 RNA 聚合酶Ⅰ催化。高等真核生物 RNA 聚合酶Ⅰ转录的初始产物是一个大的未剪接的 45S 的前体 RNA，它最终被加工成较小的 28S rRNA、18S rRNA、和 5.8S rRNA（图 2.3）。RNA 聚合酶Ⅲ承担转录 tRNA 基因、5S rRNA、一些重复元件（Fornace 和 Mitchell，1986；Lewin，2004）和前述的 snRNA、snoRNA、scRNA 等。

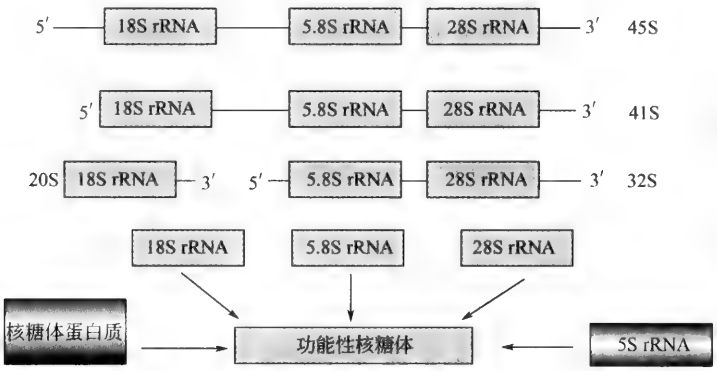


图 2.3　人细胞中 rRNA 的生物合成。RNA 聚合酶Ⅰ转录产物（45S 转录物）经剪切得 28S、18S 和 5.8S。5S rRNA 由 RNA 聚合酶Ⅲ独立转录。部分引用自 Lewin，Gene Ⅵ（1997），得到牛津大学出版社的允许

典型的哺乳动物细胞含 $1\times10^{-5}\sim5\times10^{-5}\mu g$ 的 RNA。其中大部分是聚合酶Ⅰ和聚合酶Ⅲ的转录本。约 80%～85%的细胞 RNA 以 28S rRNA、18S rRNA、5.8S rRNA 和 5S rRNA 形式存在于核糖体中，这些 RNA 与无数的核糖体特异蛋白质形成复合物（60S 和 40S 核糖体亚基）。如第 10 章的描述，大量的 28S rRNA 和 18S rRNA 可作为总细胞 RNA 或总细胞质 RNA 电泳时的天然分子量标准。表 2.2 列出了真核细胞与原核细胞的核糖体和生物功能的比较。tRNA 构成了细胞总 RNA 质量的 10%～15%，而所有 mRNA 仅占细胞总 RNA 的 1%～4%。

表 2.2　原核细胞和真核细胞的转录和翻译

项　目		原核细胞	真核细胞
转录	基因组织	大部分为多顺反子（操纵子模式），一些是单顺反子	几乎全部是单顺反子，叶绿体中发现多顺反子
	位置	单细胞间隔区	核内
	mRNA 的半衰期	2min，范围：1～10min	10h，范围：1～24h
	转录速度	每秒 40 核苷酸	每秒 40 核苷酸
	转录后修饰	几乎没有	广泛，包括 5′加帽、除去内含子、多腺苷化

续表

项　目		原核细胞	真核细胞
翻译	mRNA 的平均大小	1.2kb	1.9～2.2kb
	rRNA	23S、16S、5S	28S、18S、5.8S、5S
	核糖体亚基	50S、30S	60S、40S
	完整的核糖体	70S	80S
	位置	单细胞间隔区	细胞质
	翻译速度	每秒 15 氨基酸	每秒 5～8 氨基酸
	翻译后修饰	几乎没有	很多修饰

注：mRNA—信使 RNA；rRNA—核糖体 RNA。

历史上，rRNA 首先被认为是蛋白质合成的模板。T4 噬菌体感染大肠杆菌的研究，第一次指出 mRNA 是独立的一类 RNA，它在蛋白质合成中起模板作用（Volkin 和 Astrachan，1956；Brenner 等，1961；Hall 和 Spiegelman，1961）。后来，观察到 SV40 后期 mRNA（Ghosh 等，1978）和多瘤病毒后期 mRNA（1979）具多种 5′末端，这是第一次发现 RNA 聚合酶Ⅱ转录起始的异源性。

RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ的转录物相对来说不多样化，一般不随细胞功能变化而变化。但是 RNA 聚合酶Ⅱ的转录产物随细胞生化状态的变化而变化，这一点并不意外，因为正是 mRNA 的组成决定了细胞的表型。随细胞种类和状态的不同，RNA 聚合酶Ⅱ转录产物的差异一般在 20%～40%，但其中成熟的 mRNA 仅占 1%～4%。基于 C_0t 动力学研究，证明可以被转录加工成功能 mRNA 的基因都位于基因组中的非重复序列区域。而基因组的大部分区域被认为是不被转录的，处于细胞周期某一点的细胞，有几千个不同基因被转录。基于细胞生物化学上的复杂性，mRNA 群体中的这种异质性，对于满足细胞生存的基本需要都是必要的。有趣的是所有转录的 hnRNA 中，可能大于 70%的部分在核内被降解。这为研究基因表达转录后调控提供了一个基础。

2.4　参考文献

Benne, R., van den Berg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46,** 816.

Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **50,** 349.

Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190,** 576.

Cech, T. R., and Bass, B. L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **55,** 599.

Cech, T. R., Zaug, A. J., and Grabowski, P. J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27,** 487.

Chan, L., and Nishikura, K. (1997). Mammalian RNA Editing. *In* "mRNA Metabolism and Post-Transcriptional Gene Regulation" (J. B. Harford and D. R. Morris, Eds.). Wiley-Liss, New York.

Crick, F. (1957). On protein synthesis. Paper presented to The Society for Experimental Biology.

Dreyfuss, G., Kim, V. N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 195.

Duyk, G. M., Kim, S., Myers, R. M., and Cox, D. R. (1990). Exon trapping: A genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87,** 8995.

Flavell, A. J., Cowie, A., Legon, S., and Kamen, R. (1979). Multiple 5' terminal cap structures in late polyoma virus RNA. *Cell* **16,** 357.

Fornace, A. J., Jr., and Mitchell, J. B. (1986). Induction of B2 RNA polymerase III transcription by heat shock: Enrichment for heat shock induced sequences in rodent cells by hybridization subtraction. *Nucleic Acids Res.* **14,** 5793.

Ghosh P. K., Reddy, V. B., Swinscoe, J., Lebowitz, P., and Weissman, S. M. (1978). Heterogeneity and 5' terminal structures of the late RNAs of simian virus 40. *J. Mol. Biol.* **126,** 813.

Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W., and Watson, J. D. (1961). Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. *Nature* **190,** 581.

Hall, B. D., and Spiegelman, S. (1961). Sequence complementarity of T2 DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47,** 137.

Hamm, J., and Mattaj, I. W. (1990). Structural Analysis of U small nuclear ribonucleoproteins by *in vitro* assembly. *Methods Enzymol.* **181,** 273.

Jacob, F., and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. *Molec. Biol.* **3,** 318.

Kass, S., Tyc, K., Steitz, J. A., and Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* **60,** 897.

Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270,** 1628.

Lewin, B. (Ed.). (2004). Genes VIII. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

Marzluff, W. F., and Huang, R. C. C. (1984). Transcription of RNA in isolated nuclei. *In* "Transcription and Translation: A Practical Approach" (B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds.). IRL Press, Washington, DC, pp. 89–129.

Michel, F., and Ferrat, J. L. (1995). Structure and activities of group II introns. *Ann. Rev. Biochem.* **64,** 435.

Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10,** 459.

Roeder, R. G. (1976). *In* "RNA Polymerase" (R. Losick and M. Chamberlain, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 285–329.

Tavernier, J., Derynck, R., and Fiers, W. (1981). Evidence for a unique human fibroblast interferon (IFN-β_1) chromosomal gene, devoid of intervening sequences. *Nucleic Acids Res.* **9,** 461.

Tereba, A. (1985). Chromosomal localization of protooncogenes. *Int. Rev. Cytol.* **95,** 1.

Triesman, R., Proudfoot, N. J., Shander, M., and Maniatis, T. (1982). A single-base change at a splice site in a β^0-thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell* **29,** 903.

Volkin, E., and Astrachan, L. (1956). Phosphorus incorporation of *E. coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* **2,** 146.

Wilson, D. S., and Szostak, J. W. (1999). *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* **68,** 611.

（全由辛译；全言校）

第3章　信使 RNA

很多基因为组成型，由 RNA 聚合酶Ⅱ转录。显然，大量的核不均一 RNA(hnRNA) 在核内被代谢。真核细胞中，mRNA 由 hnRNA 通过一系列修饰反应而成熟，这包括 5′加帽、甲基化、剪接、3′末端加工以及常被聚腺苷化。真核细胞的细胞质中，只有 1%～3%的总 RNA 是成熟的 mRNA。根据细胞质内的丰度，这些 mRNA 又可分为特殊的 mRNA 种类。有三类正式的 mRNA 亚类：高丰度的、中丰度的和低丰度的。还有一类非正式的亚类，即超低丰度的 mRNA。

高丰度的转录本，每个细胞有几百个拷贝。当细胞产生大量的特定蛋白质或高度分化的蛋白质以执行某一功能时，就会产生这类转录本。中丰度的转录本在每个细胞中有成打的拷贝，很多看家基因[1]的 mRNA 处于这一数量级。低丰度的 mRNA 在每个细胞中约有 10 个或更少的拷贝。很多老的、传统的技术，如 Northern 分析（见第 12 章），很难检测到低丰度的 mRNA。用某些富集方法以增加检出的概率，这些低丰度 mRNA 就可以被测出。超低丰度的 mRNA 在每个细胞中少于 1 个拷贝，所以迫使用组织取代细胞株来观察特殊基因的转录，过去这类 mRNA 被认为是难克隆基因。更重要的是必须认识到，细胞中 RNA 的丰度会有很大的变化，这种变化可能来自细胞环境的自然变化或者实验操作的原因。

3.1　典型 mRNA 分子的拓扑结构

典型的人纤维原细胞约含 1 皮克（pg）的 mRNA，这相当于由一组 3 万～4 万个不同基因转录的 10^6 个分子。虽然这种 mRNA 的异质性反映了由这些 mRNA 编码的蛋白质有同等的多样性，但是一个典型的真核 mRNA 分子具备几乎所有 mRNA 都有的拓扑学特征（图 3.1）。

3.1.1　5′帽子

成熟的真核 mRNA 分子是由 RNA 聚合酶Ⅱ产生出来的单顺反子 mRNA。转录的中间产物——前体 hnRNA 分子，具有下面列出的 5′末端结构：

5′pppPuNNN……3′

第一个转录的核苷酸通常是嘌呤，无论是腺嘌呤还是鸟嘌呤都含有完整的 5′-三磷酸。

[1] 看家基因是指其编码的蛋白质能维持细胞活力或正常功能。因为这些基因的表达通常认为不随细胞功能状态改变而改变，所以常作为各种定量实验的内部参照，见第 20 章。

图 3.1　典型的真核 mRNA 分子的拓扑学

相邻的核苷酸由磷酸二酯键以 5′-3′连接。转录起始后不久，新生多核苷酸链尚不超过 100 个碱基时，5′帽式结构（Reddy 等，1974；Shatkin，1976；Banerjee，1980）就被逐步装配（Babich 等，1980）。帽子由少见的 5′-5′三磷酸将第一个转录的核苷酸与 7-碱基鸟嘌呤（m^7G）核苷酸连接而成。

在核内的一个酶——鸟嘌呤核苷酸转移酶催化下，末端的鸟嘌呤核苷酸加到转录物的 5′末端，产生下述结构：

$$5'GpppPuNNN\cdots\cdots 3'$$

末端鸟嘌呤核苷酸以 5′-5′方式与转录的第一个核苷酸连接。5′帽式结构末端的鸟嘌呤 7 位被鸟嘌呤-7-甲基酶甲基化。甲基化的模式结构在文献中表示为：

$$m^7G(5')ppp(5')Pu$$

大部分真核 mRNA 接着在 2′-*O*-甲基转移酶的催化下，第二个核苷酸核糖的 2′-氧被进一步甲基化。取决于不同的 mRNA，最多有 4 个甲基化反应发生。包括 5′-鸟嘌呤核苷酸以及倒数第二个核苷酸和第三个核苷酸的碱基和/或核糖，也包括 N^6-甲基腺嘌呤残基。真核 mRNA 的加帽，发生在 mRNA 内部腺苷酸的甲基化之前。腺苷酸甲基化是较少发生的修饰，它也发生在 mRNA 生物合成过程的早期。在 RNA 加工中，N^6-甲基腺嘌呤残基是保守的（Shatkin，1976；Chen-Kiang 等，1979）。甲基化的程度是 mRNA 种类的功能。高等生物通常有高度甲基化的帽子。snRNA 也有带多个甲基的帽子结构（Furuichi 和 Shatkin，1989），帽子的甲基供体是 S-腺苷酰甲硫氨酸（SAM）。

5′帽子是伴随细胞内基因表达转录后修饰的一个例子，所有真核 mRNA 中都有它的存在。5′帽子支持翻译的起始，并且非常重要，以至于体外转录 mRNA 时，如果希望转录物能支持编码蛋白质的合成，就必须进行体外加帽反应。翻译装置的形成，部分是由帽子结合蛋白质起始的（见 Shatkin 的综述，1985；Dreyfuss，1986；Lewin，2004）。此后，在起始因子的介导下，核糖体亚基结合上去。简而言之，这就是核糖体如何识别将被翻译转录物的，rRNA 和 tRNA 都没有帽子。

帽子显然还通过对抗磷酸酯酶和 5′→3′核酸外切酶的降解方式，保证了转录物的稳定性（Furuichi 等，1977；Furuichi 和 Shatkin，1989）。相反，原核 mRNA 没有 5′帽子结构，甚至 mRNA 下游部分还在翻译中，mRNA 就从 5′端被外切核酸酶降解。此外，线粒体和叶绿体 mRNA 没有 5′帽子。在真核细胞中复制的很多动物病毒 mRNA 含有 5′帽子，值得注意的是脊髓灰质炎病毒例外。

3.1.2　前导序列

从真核帽子结构的第一个核苷酸开始，即组成了不翻译的前导序列，更正规的说法是

5′非翻译区（UTR）。虽然前导序列长的可达几百个核苷酸，短的仅 3 个核苷酸，但真核系统中，典型的前导序列长约 30～50 个碱基。这个长度可变的区段，如它名字的含义，不被翻译。核糖体扫描模型中，40S 亚基结合到 5′帽子上，然后沿前导序列移动，直到第一个 AUG 密码子处才暂停。AUG 密码子是前导序列与编码区的分界。帽子结合蛋白介导了 5′帽子和 40S 亚基的结合。最后，有功能的核糖体的装配，由真核起始因子（eIfs）和其他 mRNA 结合蛋白介导（Leibold 和 Munro，1988；Dever，2002）。

3.1.3　编码区

编码区是 mRNA 的结构部分，它从第一个 AUG 密码子（也称作起始密码子）开始。真核细胞中极少数的翻译从非 AUG 密码子开始（Hann 等，1988；Florkiewcz 和 Sommer，1989）；相反，原核生物的蛋白质翻译，似乎倾向于从 GUG 和 AUG 起始。此外，已经证明，判断起始密码子需要读到“好的上下文”。早期研究认为，核糖体识别的 AUG 密码子，它的前第三个核苷酸必须是一个嘌呤，通常是 A（Kozak，1986）。现在知道，AUG 前第三个核苷酸是一个嘌呤，后面直接跟一个 G，才是翻译最佳的起始位点。这个模块被认为是指向起始密码子的标记。

编码区开始处的 AUG 密码子，使真核蛋白质氨基端是甲硫氨酸，而原核蛋白质的氨基端为甲酰甲硫氨酸。起始密码子后的每三个核苷酸，指导各种氨基酸进入新生多肽。真核多肽延伸一段时间后可能延宕（Woolin 和 Walter，1988）。延伸以这种方式持续，直到终止（无义）密码子（UAA、UAG 或 UGA）出现，也无校正 tRNA 变种出现为止。终止密码子是翻译终止的正常信号。因此，mRNA 编码区的 5′末端对应于 mRNA 翻译产物新生多肽的氨基端，3′末端对应于多肽的羧基端。典型的真核 mRNA 编码区在 200～1500 个核苷酸长度，但也有极短的和极长的 mRNA 编码区。

3.1.4　尾部序列

终止密码子外是另一个非翻译区，即尾部序列或 3′UTR 区。这个序列通常约 50～150 个碱基长度，但长达 1000 碱基的 UTR 曾被报道。甚至不同的 mRNA 分子编码相同的多肽，而其差异仅在于 3′ UTR 长度的不同（比如二氢叶酸还原酶 mRNA）。虽然 3′UTR 区的功能还不清楚，但相信它影响 mRNA 在细胞质中的稳定性。但是必须注意，很多 3′UTR 区内，离多聚腺苷酸合成起始位点 30 核苷酸以内，有高度保守的 AAUAAA 序列（Proudfoot 和 Brownlee，1976）。

3.1.5　聚腺苷尾

大部分真核 mRNA 在其 3′末端有一特征性的聚腺苷酸（Lim 和 Cannelakis，1970；Edmonds 等，1971），这个结构为 poly(A) 尾巴。它的精确长度具有指示细胞中 mRNA 种类和翻译状态的功能（Kuge 和 Richter，1995；见 Baker 的综述，1997）。hnRNA 转录后，很快就被一类在细胞核中的 poly(A) 多聚酶家族中的一个酶加上 poly(A) 结构。有趣的是，在发现 3′poly(A) 以前，早就知道 poly(A) 聚合酶。所有 poly(A) 聚合酶都表现出对 ATP 非常高的专一性，它需要带 AMP 残基可以结合上去的 3′-游离羟基的多核苷酸。

具有上述特点的 mRNA 部分叫作 poly(A) mRNA。虽然认为超过 97%的真核 mRNA

种类具有 poly(A)，在细胞质中至少有$\frac{1}{3}$的 mRNA 分子没有 poly(A) 尾，其中主要是编码组蛋白的 mRNA。当聚腺苷酸化被抑制时[1]，正常的 poly(A) mRNA 就不能从 hnRNA 中产生。如果 poly(A) 尾是 mRNA 从细胞核向细胞质运输必需的，那么没有 poly(A) 的组蛋白 mRNA 就需要一个运出核的替代方式，很可能是基于成熟组蛋白 mRNA 特有的性质。较明确的是，mRNA 通过与蛋白质形成核蛋白复合物颗粒而经核孔运输，一旦到达细胞质，mRNA 可能（也可能不）开始翻译。

已观察到很多 mRNA 聚腺苷化的调控作用，越来越多的证据支持 poly(A) 尾在稳定细胞质中某些 mRNA 方面以及在调控翻译效率方面起作用。mRNA 特殊的 5′特征和 3′特征，可能至少部分地保护它不被外切核酸酶降解。另外，接近 5′末端和/或 3′末端的序列信息，可能在细胞质的影响下，促进这些分子的降解（Jackson 和 Standar，1990；Spirin，1994；Standart 和 Jackson，1994；Curtis 等，1995）。

转录显然并不终止在聚腺苷酸化起始的位点，而是终止在下游（即 3′方向）的某个位点。首先在腺病毒系统观察到这种现象（Nevins 和 Darnell，1978；Fraser 等，1979）。聚腺苷酸化的实际起始位点，是在初始转录物尾部区内通过严格控制的剪切产生的，poly(A) 尾巴直接加到它的 3′端。剪切和聚腺苷酸化的效率，极大程度上取决于高度保守的 AAUAAA 模块，它被称为 poly(A) 信号。另一个在聚腺苷酸化起始位点下游的比较保守的富含 GU 的序列，这两个序列的精确位置关系和序列保守的程度指导了 hnRNA 在 AAUAAA 信号下游剪切，并在剪切产生的 3′-羟基处聚合 poly(A)。这些转录后修饰至少是部分由小核核糖核蛋白体（snRNP）介导的（Birnstiel 等，1985；Berget 和 Robberson，1986；Black 和 Steitz，1986；Hashimoto 和 Steitz，1986）。

聚腺苷酸化信号的重要性是很容易证明的（Fitzgenald 和 Shenk，1981；Manley 等，1985）：自发的变异、人为点突变和空间重排已经显示严重干扰了 poly(A)$^+$ mRNA 的形成。聚腺苷酸化信号虽然高度保守，但并非完全相同。例如观察到聚腺苷酸化信号（AUUAAA）存在于鸡溶菌酶 mRNA（Jung 等，1980）和一种腺病毒 mRNA 中（Ahmed 等，1982），AAUAUA 序列存在于胰腺 α-淀粉酶 mRNA 的稀有种类中（Tosi 等，1981）。进而短寿命 mRNA 的一个模块（AUUUA）被发现存在于某些肿瘤基因和细胞因子转录本中（Shaw 和 Kamen，1986）。现在被称为 ARE（富含 AU 的元件）的序列，存在于不稳定 mRNA 中，它被认为促进了 mRNA 的降解。这种五核苷酸序列位于非翻译的尾部区域，可能串联重复几次。ARE 介导了脱腺苷酸化，即 poly(A) 尾巴的切除，进而发生去稳定化，接着是核酸内切酶介导的 mRNA 降解。现在看来，聚腺苷酸化可能调控原核 mRNA 的稳定性（O'Hara 等，1995）。

虽然聚腺苷酸化信号的高度保守性质，以及腺苷酸化真核转录物的丰度，暗示着 poly(A) 尾巴在细胞中的中心作用，但 poly(A) 的生理作用以及 poly(A) 结合蛋白（polyadenylate-binding protein，PABP）[2] 的生理作用还不清楚。但是很明确的是 poly(A) 的长度与 mRNA 的稳定性及其翻译效率是有相互关系的。

---

[1] 虫草素（3′-脱氧腺苷）天然阻止聚腺苷酸化的发生（Zeevi 等，1982），但并不干扰转录或总的来说不干扰 hnRNA 合成。

[2] PABP 鉴定的方法学参见 Sachs 和 Kornberg（1990）及 Gorlach 等（1994）。

3.1.6　细胞器 mRNA

线粒体和叶绿体都有它们自己的环状染色质，因此在遗传上它们独立于细胞核染色质。这些细胞器的基因组被分别称为 mtDNA 和 ctDNA。线粒体和叶绿体基因编码的蛋白质都定位于这些细胞器。它们都输入核基因编码的蛋白质以支持正常的细胞器生理活动。

转录和翻译的机制是高度保守的，但不同细胞器中不同的 mRNA 品种存在某些结构差异。如线粒体 mRNA 不存在 5′帽子结构。虽然它的 3′端被聚腺苷酸化，但与细胞质腺苷酸化的转录物相比，它要短得多。更有甚者，线粒体 mRNA 通常使用 AUA 和 AUU 作为起始密码子，并且它们通常都很靠近 5′末端。有趣的是，从结构角度讲，酵母线粒体的 mRNA 比其他来源的线粒体 mRNA 更接近于细胞质的 mRNA。

3.2　细胞质内的稳定性

细胞质中，多核糖体和非多核糖体形式的两种 mRNA 以信使核糖核蛋白体（mRNP）复合物形式存在。虽然大部分多核糖体贴在细胞骨架（Lenk 等，1977；Howe 和 Hershey，1984）上，但是这种结合和随之而来的翻译并非绝对必需。poly(A) 尾巴和其长度显然起着稳定 mRNA 的作用。使 poly(A) 缩短可导致去稳定化（Decker 和 Parker，1994；Beelaman 和 Parker，1995）。如酶法除去蛙卵球蛋白 poly(A)，因为快速降解，mRNA 迅速失去翻译活性（Huez 等，1974；Marbaix 等，1975）。研究已证明这种 3′ARE 的作用。这些序列的缺失，大大降低了脱腺苷酸的速度，因此延长了 mRNA 在胞质中的寿命（Wilson 和 Treisman，1988；Shyu 等，1991；Decker 和 Parker，1993；Chen 和 Shyu，1994）。最后，越来越多的证据显示，5′UTR 和 3′UTR 的长度及核苷酸组成对于转录本的稳定性起着以前所不知道的作用（综述见 Lewin，2004）。

3.3　调控水平

历史上用腺病毒和 SV40 进行的实验（Nevins 综述，1983），首次显露出生化反应与有生物功能的 mRNA 合成联系在一起。虽然人们曾经相信很多这样的性状与真核 mRNA 的相同，近来的研究显示，由 RNA 形成的二级结构和三级结构，以及大量的 RNA 结合蛋白，都与转录物转录后行为有关。在活细胞中，可能的调控点的数量是非常多的。从最广义上讲，这些数量巨大的可能的调控点可以归入四个主要的类型（图 3.2）：转录调控；转录后调控；翻译调控；翻译后调控。

在亚细胞水平，真核 RNA 分子在核内被转录和加工，这是细胞的初始调控。在那里，RNA 分子有了正确的修饰，通过剪接去掉内含子序列，可能从核转运到胞质。已有综述阐明这种很独特的核-质转运机制的细节（Pinol-Roma 和 Dreyfuss，1993；Maquat，1997），它涉及 mRNA 移动到核孔并通过核孔复合物。在细胞质中，成熟的 mRNA 可能与翻译装置结合，也可能不与翻译装置结合。事实上，细胞质 RNA 的化学稳定性本身就是基因表达的一个调控点。在这里重申这一点是重要的，虽然大多数 mRNA 进入多核糖体复合物，但形成非翻译 mRNA：蛋白质复合物是一个可能的翻译调控点。过去已经用“信息体”这个术语描述这种非翻译胞质 mRNA：蛋白质复合物（Preobrazhensky 和 Spirin，1978；Bag，

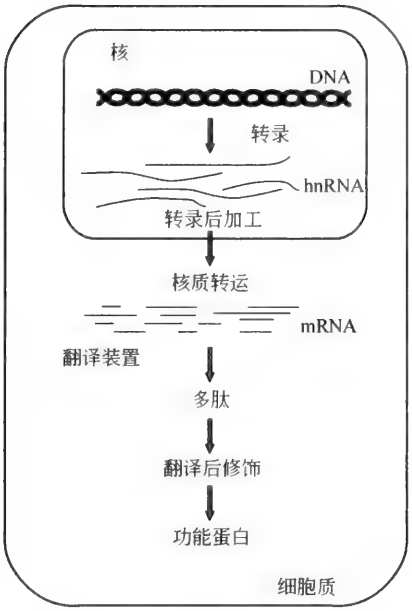


图 3.2 细胞中，基因表达受到很多关键点的调控，从细胞基因组编码的信息开始，通过 mRNA 的生物合成到作为功能蛋白的最后表现。细节见正文

1991)。如果一个 mRNA 分子确实被翻译，其初始产物多肽通常将经受各种翻译后修饰。最可能的是该多肽被切除信号序列。其他常见的翻译后修饰包括（但并不局限于此）剪切、酰基化、甲基化、异戊烯基化、羧基化、糖基化、磷酸化、羟基化等。

任何影响转录效率或阻止转录的变化，都被说成是作用于转录水平（转录调控）。任何影响 hnRNA 的剪接、hnRNA 分子稳定性、核-质转运或在细胞质中的稳定性的事件，都被说成是在转录后起作用（转录后水平），这类事件的确是多种多样的。如虽然组织培养中哺乳类细胞多达半数的 mRNA 其半衰期长达几个小时，但是很多 mRNA 的半衰期仅约 10min 或更短，这种时间的短暂常常是基因表达的天然调节器。同样，环境刺激显然可以显著影响特殊 mRNA 种类的稳定性（Buckingham 等，1974；Baumbach 等，1984；Knight 等，1985）。发生在翻译和翻译后水平的调控，通常暗示细胞质中成熟 mRNA 在蛋白质合成或合成以外某种程度上受到翻译水平的干扰。

显然，细胞群体的生化状态是可以定量和定性地定义为细胞破碎时 mRNA 复杂性的函数。如研究者可能希望确定在模式系统中，观察到的基因表达调控是转录水平的调控，还是转录后水平的事件。在这种情况下，细胞破碎和 RNA 纯化方法必须允许进行核内易检测基因转录本的丰度分析，而不受细胞质的影响同样可以进行单独细胞质的分析。此外，转录速度的研究，需要分离完整的细胞核，完整的核才能支持起始转录物的延伸，可以进行同位素掺入标记（见第 17 章）。因此，RNA 从生物样品中纯化的条件，必须能确保 RNA 的化学稳定性，并保证整个过程中核糖核酸酶处于失活状态。即使算不上必需的话，特别注意的细节常常是 RNA 分离和后续分析成败的决定因素。

3.4 参考文献

Ahmed, C. M. I., Chanda, R. S., Snow, N. D., and Zain, B. S. (1982). The nucleotide sequence of mRNA for the M_r 19000 glycoprotein from early gene block III of adenovirus 2. *Gene* **20,** 339.

Babich, A., Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1980). Early capping of transcripts from the adenovirus major late transcription unit. *Nature* **287,** 246.

Bag, J. (1991). mRNA and mRNP. *In* "Translation in Eukaryotes," pp. 71–79. CRC Press, Ft. Lauderdale, FL.

Baker, E. J. (1997). mRNA polyadenylation: Functional implications. *In* "mRNA Metabolism and Post-Transcriptional Gene Regulation" (J. B. Harford and D. R. Morris, Eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 85–106.

Banerjee, A. K. (1980). 5′-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **44,** 175.

Baumbach, L. L., Marashi, F., Plumb, M., Stein, G., and Stein, J. (1984). Inhibition of DNA replication coordinately reduces cellular levels of H1 histone mRNAs requirement for protein synthesis. *Biochemistry* **23,** 1618.

Beelman, C. A., and Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81,** 179.

Berget, S. M., and Robberson, B. L. (1986). U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for *in vitro* spicing but not for polyadenylation. *Cell* **46,** 691.

Birnstiel, M. L., Busslinger, M., and Strub, K. (1985). Transcription termination and 3′ end processing: The end is in site! *Cell* **41,** 349.

Black, D. L., and Steitz, J. A. (1986). Pre-mRNA splicing *in vitro* requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **46,** 697.

Brawerman, G. (1976). Characteristics and significance of the polyadenylate sequence in mammalian messenger RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **17,** 117.

Buckingham, M. E., Caput, D., Cohen, A., Whalen, R. G., and Gros, F. (1974). The synthesis and stability of cytoplasmic messenger RNA during myoblast differentiation in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71,** 1466.

Chen, C. Y. A., and Shyu, A. B. (1994). Selective degradation of early-response-gene mRNAs: Functional analysis of sequence features of the AU-rich elements. *Mol. Cell. Biol.* **14,** 8471.

Chen-Kiang, S., Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1979). N-6-methyl-adenosine in adenovirus type 2 nuclear RNA is conserved in the formation of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* **135,** 733.

Curtis, D., Lehmann, R., and Zamore, P. D. (1995). Translational regulation in development. *Cell* **81,** 171.

Decker, C. J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: Evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* **7,** 1632.

Decker, C. J., and Parker, R. (1994). Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **19,** 336.

Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108,** 545.

Dreyfuss, G. (1986). Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Ann. Rev. Cell Biol.* **2,** 459.

Edmonds, M., Vaughn, M. H., Jr., and Nakazato, H. (1971). Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly labeled poly-ribosomal RNA of HeLa cells: Possible evidence for a precursor relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68,** 1336.

Fitzgerald, M., and Shenk, T. (1981). The sequence 5′-AAUAAA-3′ forms part of the recognition site for polyadenylation of late sv40 mRNAs. *Cell* **24,** 251.

Florkiewcz, R. Z., and Sommer, A. (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: Three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86,** 3978.

Fraser, N. W., Nevins, J. R., Ziff, E., and Darnell, J. E. (1979). The major late adenovirus type-2 transcription unit: Termination is downstream from the last poly(A) site. *J. Mol. Biol.* **129,** 643.

Furuichi, Y., LaFiandra, A., and Shatkin, A. J. (1977). 5′-terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266,** 235.

Furuichi, Y., and Shatkin, A. J. (1989). Characterization of cap structures. *Methods Enzymol.* **180,** 164.

Görlach, M., Burd, C. G., and Dreyfus, G. (1994). The mRNA poly(A)-binding protein: Localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp. Cell Res.* **211,** 400.

Hann, S. R., King, M. W., Bentley, D. L., Anderson, W. C., and Eisenman, R. N. (1988).

A non-AUG translational initiation in *c-myc* exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* **52,** 185.

Hashimoto, C., and Steitz, J. A. (1986). A small nuclear ribonucleoprotein associates with AAUAAA polyadenylation signal in vitro. *Cell* **45,** 581.

Howe, J. G., and Hershey, J. W. B. (1984). Translation initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework from HeLa cells. *Cell* **37,** 85.

Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Leclercq, M., Nudel, U., Soreq, H., Salomon, R., Lebleu, R., Revel, M., and Littauer, U. Z. (1974). Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71,** 3143.

Jackson, R. J., and Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3′ untranslated region control mRNA translation? *Cell* **62,** 15.

Jung, A., Sippel, A. E., Grez, M., and Schutz, G. (1980). Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77,** 5759.

Knight, E., Anton, E. D., Fahey, D., Friedland, B. K., and Jonak, G. J. (1985). Interferon regulates *c-myc* expression in Daudi cells at the post-transcriptional level. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82,** 1151.

Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation in eukaryotes. *Cell* **44,** 283.

Kuge, H., and Richter, J. D. (1995). Cytoplasmic 3′ poly(A) addition induces 5′ cap ribose methylation: Implications for translational control of maternal mRNA. *EMBO J.* **14,** 6301.

Leibold, E. A., and Munro, H. N. (1988). Cytoplasmic proteins binds *in vitro* to a highly conserved sequence in the 5′ untranslated region of ferritin heavy and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85,** 2171.

Lenk, R., Ransom, L., Kaufman, Y., and Penman, S. (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* **10,** 67.

Lewin, B. (Ed.). (2004). "Genes VIII." Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

Lim, L., and Cannelakis, E. S. (1970). Adenine-rich polymer associated with rabbit reticulocyte messenger RNA. *Nature* **227,** 710.

Manley, J. L., Yu, H., and Ryner, L. (1985). RNA sequence containing hexanucleotide AAUAAA directs efficient mRNA polyadenylation *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **5,** 373.

Maquat, L. E. (1997). RNA Export from the Nucleus. *In* "mRNA Metabolism and Post-Transcriptional Gene Regulation" (J. B. Harford and D. R. Morris, Eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 107–126.

Marbaix, G., Huez, G., Burny, A., Cleuter,Y., Hubert, E., Leclercq, M., Chantrenne, H., Soreq, H., Nudel, U., and Littauer, Z. (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72,** 3065.

Nevins, J. R. (1983). The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* **52,** 441.

Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: poly(A)$^+$ nuclear sequences are conserved and poly (A) addition precedes splicing. *Cell* **15,** 1477.

O'Hara, E. B., Chekanova, J. A., Ingle, C. A., Kushner, Z. R., Peters, E., and Kushner, S. R. (1995). Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92,** 1807.

Piñol-Roma, S., and Dreyfus, G. (1993). hnRNP proteins: Localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell. Biol.* **7,** 151.

Preobrazhensky, A. A., and Spirin, A. S. (1978). Informosomes and their protein compo-

nents: The present state of knowledge. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **21,** 1.

Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976). 3′ Non-coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. *Nature* **263,** 211.

Reddy, R., Ro-Choi, T. S., Henning, D., and Busch, H. (1974). Primary sequence of U-1 nuclear ribonucleic acid of Novikoff hepatoma ascites cells. *J. Biol. Chem.* **249,** 6486.

Sachs, A. B., and Kornberg, R. D. (1990). Purification and characterization of polyadenylate-binding protein. *Methods Enzymol.* **181,** 332.

Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9,** 645.

Shatkin, A. J. (1985). mRNA cap binding proteins: Essential factors for initiating translation. *Cell* **40,** 223.

Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from 3′ untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective messenger RNA degradation. *Cell* **46,** 659.

Shyu, A. B., Belasco, J. G., and Greenberg, M. E. (1991). Two distinct destabilizing elements in the *c-fos* message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. Genes Dev. **5,** 221.

Spirin, A. S. (1994). Storage of messenger RNA in eukaryotes: Envelopment with protein, translational barrier at 5′ side, or conformational masking by 3′ side. Mol. Reprod. Dev. **38,** 107.

Standart, N., and Jackson, R. J. (1994). Regulation of translation by specific protein/mRNA interations. Biochimie **76,** 867.

Tosi, M., Young, R. A., Hagenbuchle, O., and Schibler, U. (1981). Multiple polyadenylation sites in a mouse α-amylase gene. Nucleic Acids Res. **9,** 2313.

Wilson, T., and Treisman, R. (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3′ AU-rich sequences. Nature **336,** 396.

Woolin, S.L., and P. Walter. (1988). Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. EMBO J. **7,** 3559.

Zeevi, M., Nevins, J. R., and Darnell, J. E., Jr. (1982). Newly formed mRNA lacking polyadenylic acid enters the cytoplasm and the polyribosomes but has a shorter half-life in the absence of polyadenylic acid. Mol. Cell Biol. **2,** 517.

（金言译；金由辛校）

第4章　核糖核酸酶

4.1　基本原理

RNA本身不稳定，加之核糖核酸酶（RNase）普遍存在，使分离全长RNA分子更为困难。核糖核酸酶是一个大家族，基本上所有细胞都有RNase。这些RNase能够通过外切和内切的方式降解RNA。对于科研人员来说，RNase活性有好处也有坏处。如果想分离完整的RNA分子，用于后续的反转录聚合酶链反应（RT-PCR）、Northern分析或其他研究，RNase则有害。如果要求将RNA除掉，RNase则有益。

胰脏中的RNase很特别，能够很快恢复活性。它们的分子量小，有4个二硫键维持其三级结构，特别稳定（Blackburn和Moore，1982）。很多变性条件（包括煮沸）处理后，胰脏RNase活性能够迅速恢复（Sela等，1957）。RNase所需要的辅助因子很少，在广泛的pH范围内都有活性。很明显，研究人员从实验开始，就要保证实验所用的器皿和试剂没有RNase的污染。对于大多数熟悉RNA研究的分子生物学家来说，所谓的消毒器皿和试剂，就是说这些器皿和试剂没有RNase的污染。

很多研究人员常常忽视了RNase导致的样品降解，而更重视研究进度。这部分归因于现在已经有商家提供从各种材料方便分离RNA的试剂。如此一来，研究人员就能够省去很多传统技术控制RNase活性所花费的时间，而控制RNase活性常常不再是研究人员关心的重要问题。这是一种很不好的学术态度。尽管没有人怀疑纯化RNA用的试剂具有抑制RNase活性的性质。但是分离试剂除去后，关注RNA分子的稳定性却具有更大的重要性。例如，纯化的RNA样品对核酸酶的敏感性不比将RNA样品储存在缓冲液［如TE（10mmol/L Tris，1mmol/L EDTA，pH7.5）］或水中严重。不幸的是，损失有价值样品常是惨痛的教训，应该在分离纯化前、过程中以及分离纯化后，认真保持RNA的稳定性。正确储存已纯化RNA的方法在第5章中有介绍。

4.2　核糖核酸酶活性的消除

控制核糖核酸酶（RNase）活性的方式，必须与细胞裂解方案兼容。如果研究工作要求分离完整的细胞器（尤其是细胞核），细胞裂解缓冲液相对温和，常常将RNase抑制剂直接加入这种裂解缓冲液中。例如分别考察细胞核RNA和细胞质RNA，从而评估基因调控水平的课题。为此，抑制RNase活性的方法，必须有利于后续分离纯化操作时维持RNA分子的完整性，有些分离操作相当费时。另外，从纯化后的RNA制品中，除去用于抑制RNase

活性的试剂必须容易，以免这些试剂干扰后续的操作。

这些实际情况迫使从下列两个方面控制 RNase 活性。

① 控制外部 RNase 活性。从试验开始以及实验进行中要鉴定并消除外部 RNase 污染。这些 RNase 污染源包括（但不局限于）器皿、包装化学药品的容器、未经二乙基焦碳酸酯处理的水、凝胶盒、梳子、被微生物或真菌污染的缓冲液。但唯一最大的污染源是手指上的油脂，它含有大量的 RNase。因此，防止 RNase 污染的首要措施是操作人员必须戴手套。

② 控制内源性 RNase 活性。除了偶然的实验室环境造成 RNase 污染外，研究人员应该深刻地认识到，必须避免内源性 RNase 对 RNA 的降解。正常情况下，细胞内的 RNase 与 RNA 是隔离的。在裂解细胞时，被隔离的 RNase 将被释放出来。游离的 RNase 能够水解 RNA，因此要及时抑制这些 RNase 活性。由于不同组织所含的 RNase 差异很大，因此具体的抑制 RNase 活性的措施取决于组织或细胞的种类。对于内源性 RNase 活性水平的认识来源于文献和个人经验。

在所有情况下，尤其是首次接触到新的细胞类型或组织时，在保证与试验方案不冲突的情况下，要尽最大努力采取严格措施控制 RNase 活性。否则就有 RNA 样品被降解的危险，获得的 RNA 样品被降解而无法使用。那些能够最好地分离 RNA 的实验室，通常有一个分离 RNA 专用的试剂库。这个库的试剂只用于 RNA 分离及其后续操作，决不用于其他实验。

4.3　核糖核酸酶抑制剂的种类

可以将控制核糖核酸酶（RNase）活性的化合物分为两大类：特异性 RNase 抑制剂和非特异性 RNase 抑制剂。有些 RNase 抑制剂能直接加入细胞裂解缓冲液和反应缓冲液中抑制 RNase 活性，而另一些 RNase 抑制剂只能在试剂准备过程中使用。将 RNase A、测试 RNA 和 RNase 抑制剂一同保温，然后用琼脂糖凝胶电泳观察测试 RNA 的降解情况，评价 RNase 抑制剂在特定系统中的有效性（第 8 章中图 8.1）。如果发生 RNA 降解，就要修改实验方案。为了满足这些需要，生物技术公司已经开发了很多 RNase 抑制剂。研究人员能够直接从公司购买这些试剂。

4.3.1　特异性 RNase 抑制剂

4.3.1.1　氧钒核糖核苷复合物

20 世纪 70 年代中期开发的氧钒核糖核苷复合物（VDR）是在细胞温和裂解条件下使用的 RNase 抑制剂。VDR 使用时间并不很长，主要有下列三个原因：①后来开发出更强的 RNase 抑制剂用于 RNA 分离；②残留的痕量的 VDR 会抑制 mRNA 的体外翻译（Berger 和 Birkenmier，1979；Berger 等，1980）；③VDR 有副作用，能抑制反转录酶活性。因此，在 RT-PCR 和很多相关的操作中禁止使用 VDR。若纯化 RNA 用于这些目的，建议不要使用 VDR。

VDR 是氧钒离子和一种或四种核糖核苷形成的复合物，其钒离子替代了磷酸（Leinhard 等，1971；Berger 和 Birkenmier，1979）。这些复合物可以作为过渡态类似物。缺乏 VDR 时，RNase 能够裂解 RNA 的磷酸二酯键，产生二环过渡态中间物，后者在一个水分子攻击下发生断裂。作为一种 RNA 类似物，氧钒核糖核苷复合物能形成高度稳定的二环，使酶不可逆地与这种复合物结合。因此，VDR 是通过将 RNase 锁定于过渡态假底物，进而

抑制 RNase 活性的。VDR 能够与广谱的细胞内 RNase 紧密结合，而且适用于包括蔗糖梯度离心等不同细胞分级分离方法（Benecke 等，1978；Nevins 和 Darnell，1978）。简言之，VDR 是通过它与 RNase 不可逆结合而抑制 RNase 活性的。如果需要分离细胞浆中的总 RNA（而不是细胞总 RNA），用于 Northern 分析或核酸酶保护检测来评估转录后 RNA 的情况，实验室会偶尔使用 VDR。尽管使用 VDR 控制 RNase 活性价廉、有效，但是在 PCR 实验中选用 VDR 是不合适的。

通常将 VDR 制备成 200mmol/L 的储备溶液（见本章实验方案）。根据预测的 RNase 水平，VDR 使用的终浓度是 5～20mmol/L。已经证实这个浓度可以抑制细胞内高水平的 RNase 活性（Berger 和 Birkenmier，1979）。VDR 抑制胰脏 RNase A 和 RNaseT_1 特别有效，但不能抑制 RNase H。VDR 还能抑制 poly(A) 聚合酶家族的活性，这种酶对进行的实验可能无关。用 VDR 抑制了细胞裂解液的核酸酶活性后，用含有 0.1%(1g/L)8-羟基喹啉的有机溶液反复抽提除去 VDR。8-羟基喹啉是 RNase 的部分抑制剂。另外，加入 10mol 量的乙二胺四乙酸（EDTA）也能除去 VDR。但是研究人员必须记住，不到 1mol 量的 EDTA 就足以解离 VDR 复合物。因此，使用 VDR 时不能使用含有 EDTA 的缓冲液。只有使用了另一种核酸酶抑制剂，如苯酚：氯仿加入裂解液中，才可以使用含有 EDTA 的缓冲液。

4.3.1.2 RNasin

VDR 的优秀替代物是一种商品多肽类 RNase 抑制剂，如 RNasin（Promega，Madison，WI）。这种核酸酶抑制剂能抑制核酸酶活性，克服使用 VDR 的问题。早先从人胎盘和鼠肝抽提这类蛋白质。后来，用克隆这种基因或其他来源的类似基因的方法保证这类蛋白质的大量供应。RNasin 相对分子质量是 51000，它抑制核酸酶活性高度依赖二巯基苏糖醇（DTT）[1]。RNasin 以竞争性非共价方式与核酸酶结合抑制 RNase 活性。其结合常数是 $K_i = 4.4 \times 10^{14}$（Blackburn 等，1977；Blackburn，1979）。厂家提供的非重组 RNasin 是从猪肝分离的，因此，其制品不存在人 DNA 的污染。这种 RNase 抑制剂能够用于人的临床和诊断。

常规使用的 RNasin 浓度是 250～1000U/ml，能够有效地抑制 RNase A、RNase B 和 RNase C 的活性，但不能抑制 RNase T_1、S1 核酸酶或曲霉菌的 RNase（Promega 产品 insert）。更新的非特异性 RNase 抑制剂，如 SUPERase. In（Ambion，Austin TX），能够抑制更为广谱的 RNase 活性。

用 RNasin 控制核酸酶活性的主要优点是它们与不同的体外反应兼容。在这方面，它比 VDR 好得多。RNasin 能够保护合成 cDNA 的 mRNA 模板（de Martynoff 等，1980）；在体外转录中，RNasin 能提高 RNA 的产量、维持 RNA 分子的完整性（Scheider 等，1988）；RNasin 能够提高体外翻译的多肽产量，提高多聚核糖体的活性（Scheele 和 Blackburn，1979）。使用 RNasin 时，必须避免过强的变性条件，如高浓度的尿素或加热到 65℃，这些条件会导致 RNase-RNasin 复合物的解离，导致 RNase 活性的恢复。

4.3.2 非特异性 RNase 抑制剂

至今已经广泛报道了各种非特异性 RNase 抑制剂的应用。使用这些化合物的目的是抑

[1] 有些核酸酶抑制剂所需的 DTT 浓度很高，过高浓度的 DTT 对某些后续反应不利。必须保障后续应用与所用 DTT 的兼容性。

制所有内源性 RNase 活性。在 RNA 分离过程中，这些化合物的使用能不同程度地抑制 RNase 活性。尽管还没有一种化合物在各种条件下能够取得完全成功的效果。但是一个或几个这样的化合物能够有效控制 RNase 活性，而其他的方法达不到这个目的。这些非特异性抑制剂包括肝素（Palmitor 等，1970；Cox，1979）、碘乙酸、聚乙烯硫酸酯（dextran）、阳离子表面活性剂（Dahle 和 Macfarlane，1993）、硅藻土（clays macaloid）和皂土（bentonite）（综述见 Blumberg，1987）。除了在生物技术和药物方面的应用外，皂土在制酒业的应用可以追溯到 20 世纪 30 年代中期（Saywell，1934），今天几乎达到普及的程度（Blade 和 Boulton，1988）。早期已经报道了用于抑制 RNase 活性的黏土的制备方法（Fraenkel-Conrat 等，1961；Poulson，1973；Blumberg，1987），但是现在用黏土抑制 RNase 活性的例子不多。

也许在实验室更容易获得过氧化氢稀释液（3%），以及氢氧化钠（0.5mol/L）和十二烷基硫酸钠（SDS）（0.1%～0.5%）的混合物。有些研究人员并不想在实验室自制试剂来抑制 RNase 活性，可以从厂家直接购买已经制备好的抑制 RNase 活性的试剂。如同后面介绍的，这些试剂能够很好地消除器皿表面的 RNase 活性，已被广泛地用于 RNA 制备。

4.4　器皿和试剂的准备

如同前文所述，准备器皿和配制试剂、做 RNA 实验尤其是抽提 RNA 时，戴手套是最重要的。手指上的油脂物，尤其是实验室技术人员手指的油脂物，有很多 RNase，是 RNase 污染的最大来源。由于门锁、微量移液器、冰箱门把手、电话话筒也是潜在的 RNase 污染源，因此在进行与 RNA 有关的实验时，要毫不犹豫地更换几次新手套。原则是离开实验台要脱手套，回到实验台要戴新手套。这要写进研究 RNA 的方法中。

关于实验室塑料制品，选用那些独立包装的、血清学级的移液管进行 RNA 实验不需要预处理。厂家已经盖紧盖子的、排列整齐的聚丙烯和聚苯乙烯类的 15ml 和 50ml 的锥形离心管，可以看作是已经消毒的离心管加以使用。一般来说，用于组织培养无菌标准的塑料制品，不大可能有 RNase（除非后续操作污染），在使用这些塑料管进行 RNA 实验时仍必须戴手套。主要是操作和从一个袋子取出分装的过程，使大包装的聚丙烯塑料制品成为潜在的 RNase 污染源。微量离心管和聚丙烯微量枪头，它们也可能成为污染源，进而污染储备液。因此与 RNA 样本直接或间接接触的任何塑料制品，凡能消毒的都要消毒。要戴上手套将大包装的微量离心管分装到 500ml 的玻璃烧杯中，用铝膜包装后消毒。戴手套将这些消毒后的微量离心管放置在 RNA 实验专用处。

如果必须使用玻璃器皿，如进行有机溶剂缓冲液抽提操作，使用含苯酚和氯仿等有机溶剂的混合物时，要独立包装硼硅玻璃移液管。反复使用的玻璃器皿必须保存在 RNA 实验专用处，不要在实验室普遍使用。与一般想法相反，高压消毒过程中的温度和压力，并不能消除 RNase 活性。但在干热烘箱中烘烤能够消除玻璃器皿的 RNase。玻璃器皿要严格清洗，先用没有 RNase 污染的水冲淋（后面会讨论），然后在 200℃ 左右烘烤 3～4h。这种方法除去玻璃器皿 RNase 活性非常有效。必须注意，并不是实验室所有的器具都能够耐受干热烘箱的烘烤。如果特殊塑料或其他材料制品需要消毒，在烘烤前要检查厂家提供的书面资料，或电话询问确定这种材料能否耐受高温烘烤。最后，实验室所有的

储备液和实验溶液都要标上制备日期和预计的使用日期。用过期的甚至更糟的旧溶液，做实验将导致糟糕结果。其原因是该瓶子中的微生物产生的 RNase 污染了瓶子中的溶液。

4.4.1 二乙基焦碳酸酯

当心 二乙基焦碳酸酯（DEPC）是致癌物，操作时要非常仔细。必须采取制造厂家提出的所有安全预防措施。

高压灭菌并不能保证彻底消除溶液、实验室塑料制品和其他器械所污染的 RNase 活性。仅用高压灭菌处理的缓冲液可能还有 RNase 活性残余。若不注意这些细节，获得的数据在代表性和重复性上将产生严重问题。为避免此种现象的发生，在作者看来，直接购买厂家预先制备的无 RNase 活性的溶液，是值得的投资。另外，实验室制备的储备液和缓冲液也可以直接或间接用 RNase 抑制剂（如 DEPC）处理。

DEPC 是一个有效的非特异性 RNase 抑制剂[1]。它能够消除试剂中的 RNase 活性。虽然现在可以使用更容易、毒性更低的处理方法去除 RNase 活性（后面将介绍），但是历史上做 RNA 工作的人，曾经用 DEPC 处理玻璃器皿，除去 RNase 活性。在制备溶液和缓冲液时，DEPC 要加到最终浓度为 0.05%（体积分数）[2]。然后将缓冲液置于摇床（例如 Lab-Line 摇床）上振荡数小时或用磁力搅拌器剧烈搅拌 20～30min。这样处理后，必须彻底除去溶液中剩余的 DEPC。常用的除去 DEPC 方法是高压消毒。在高压消毒的温度和压力条件下，DEPC 完全降解成二氧化碳和乙醇。而该条件下二氧化碳和乙醇挥发性很大。另一种方法是，有些溶液能够耐受 60℃过夜[3]，在通风橱中将瓶盖稍松的溶液置于 60℃保温过夜，这样也可以破坏 DEPC。用 DEPC 处理大量的水时，在通风橱中煮沸 1h 亦可除去 DEPC。DEPC 不仅是致癌剂（所以操作要仔细，DEPC 处理溶液后剩余的 DEPC 要彻底除去），而且 DEPC 对腺嘌呤核苷酸亲和力很强。即使是痕量的 DEPC，也能化学修饰腺嘌呤碱基（Henderson 等，1973），从而改变 RNA 的物理性质、损伤其体外翻译（Ehrenberg 等，1974）和其他性能，包括印迹分析和 PCR 实验（个人观察）。这就是无人将 DEPC 直接加入细胞悬浮液或裂解液中纯化 RNA 的原因。

用无污染 RNase 的磁力棒迅速搅拌加热的溶液能够彻底除去 DEPC。通常情况下，高压消毒时间不足够长时，能够嗅到溶液中残余 DEPC 特有的味道。在实验室高压消毒完全除去溶液中的 DEPC 后，通常溶液在消毒锅中还要维持 30min 左右。

重要提示

① 不要将 DEPC 加入含有巯基或一级氨基的溶液中，因为这些基团能够与 DEPC 发生反应（Berger，1975）。不能用 DEPC 处理的最常用的缓冲液是 Tris（三羟甲基氨基甲烷）缓冲液。替代措施是先用 DEPC 处理水并用高压消毒除去 DEPC，然后用这样的水制备含有 Tris 的溶液，最后再高压消毒。

② 有些缓冲液含有与 DEPC 不兼容的化学试剂，不能用 DEPC 处理去除 RNase，要用硝基纤维素膜过

---

[1] 由于组氨酸和酪氨酸残基的修饰，能够有效抑制某些蛋白质的活性，多年前有人用 DEPC 破坏质粒抽提过程中的蛋白质。这是一种很糟糕的技术，现在无人使用。

[2] 早先的报告提议使用 0.1% DEPC，但是使用 0.05%DEPC 消除 RNase 污染的效果与使用 0.1% DEPC 处理的效果相当。考虑到掺入 DEPC 需要用高压消毒除去，现在使用 DEPC 的浓度为 0.05%。

[3] 重要事项：有些溶液，如 SDS、NP-40 或 NaOH 溶液，不能用高压消毒或加热处理。这些组分只能在其他组分已经加入并被制作成无 RNase 污染的溶液后加入。

滤两次，以除去 RNase 和其他痕量的蛋白质。

③ 电泳器具，包括凝胶梳子、制胶盘和凝胶盒内部，可以用经过 DEPC 处理并高压消毒除去了 DEPC 的水浸泡冲洗。注意，绝对不可以将电泳器具直接与 DEPC 溶液接触，因为丙烯酸类塑料化合物对 DEPC 敏感。参见另一种消毒方法“4.4.3 过氧化氢”。

许多 RNase，包括特别容易复活的胰脏 RNase，经 RNase 抑制剂处理并除去 RNase 抑制剂后核酸酶活性仍能恢复。保存 RNA 专用的化学品和储备液要谨慎。简单的方法是将消毒后的试剂分装成适当体积，而不是从储备液中反复取出。分装后的每份溶液要一次性使用。尽管这种操作初看起来有些多余，但是排除了偶然的 RNase 污染，有利于回收最高质量的 RNA。最后别忘了化学固体药品的称量要用没有 RNase 的药匙。

4.4.2　替代方法——用消毒水冲洗

还有一些原因阻止在实验室使用 DEPC。有如下三个原因。

① DEPC 有毒，不适合那些操作不规范的实验室。因为操作不当对健康有害。

② DEPC 很难从试剂中除去，残余的 DEPC 会干扰后续的 PCR 或其他反应。DEPC 使用过量会导致后续的 PCR 反应或其他反应失败。多年来，没有获得良好结果的实验室，许多研究人员承认他们使用了浓度达 0.5%～5%的 DEPC。

③ 有些情况下测不出 RNase 活性。虽然这样的情况不普遍，但是很走运。

一个合适的替代方式，是从靠得住的厂家购买无 RNase 的水，这样就无需自己用 DEPC 处理来制造无 RNase 污染的水。对于那些医院附属的实验室，标有“冲淋用水”中没有污染物，适用于 RNA 工作。纯化后的 RNA 可以溶于这些水中，储存于－80℃。这种水也适于无 RNase 的储备液稀释。尽管通常使用买来的水比较贵，但是使用方便，不必再用 DEPC 处理。

4.4.3　过氧化氢

毫无疑问，实验室设备和器具，包括凝胶梳子、制胶盘、电泳槽和量筒等，需要除去 RNase。将这些物品在 3%的过氧化氢溶液中浸泡也能非常有效地除去 RNase 活性。这种溶液在药店能够买到，价格非常便宜。双氧水是一种强氧化剂，浸泡 20～30min 后就能够消除器皿表面的 RNase 活性。然后用大量的至少高温消毒过一次的水冲洗。不要使用标准化学试剂公司通常提供的高浓度的双氧水（如 30%）。在这么高的浓度下，双氧水很危险，对丙烯酸类凝胶盒组件和其他设施带来不可修复的损伤，还会损伤研究人员。此外要避免使用陈旧的过氧化氢溶液，因为这些溶液可能不再是双氧水溶液。

4.4.4　氢氧化钠和十二烷基硫酸钠

一个较老的除去实验室表面 RNase 活性的方法，是将能够耐受的器具浸泡在氢氧化钠-十二烷基硫酸钠（SDS）溶液中，或者用这种溶液擦器具表面。这种溶液含有 0.5mol/L NaOH 和 0.5% SDS。读者在使用这种溶液时要当心。氢氧化钠-十二烷基硫酸钠溶液处理后，要深度清洗除去碱。若不清洗干净则对实验室其他研究人员的健康有害，而且残余的 NaOH 还会碱性水解 RNA 样品。即使用水冲淋就能除去残余的 NaOH，但这个方案没有使用双氧水省钱，尤其是当购买的溶液是预先混合的氢氧化钠-十二烷基硫酸钠溶液时。

4.5 控制核酸酶活性的其他试剂

下面列出了常用的降低或消除核糖核酸酶活性的试剂。这些试剂常常与 RNA 分离缓冲液混合使用，而不是单独使用。对于那些富含核糖核酸酶的细胞，甚至是那些核糖核酸酶含量不高的细胞，广泛接受的能够获得一致结果的方案，是在裂解缓冲液中加入硫氰酸胍或盐酸胍。本书中还介绍其他优秀的强变性方法。由于它们具有离液序列极高的性质，这些缓冲也能够相当有效地破坏很多组织和培养细胞。如同第 5 章所介绍的，用含有胍的缓冲液裂解细胞的缺点，是细胞核和细胞质的 RNA 混在一起。如同原先所介绍的，缺乏强变性剂的裂解缓冲液，在使用前必须添加核糖核酸酶抑制剂。多数生物技术公司能够提供一种或几种试剂，用来专门除去实验室台面和其他表面的核糖核酸酶。

4.5.1 盐酸胍

盐酸胍（G·HCl）是一种强的离子型蛋白质变性剂。在工作浓度 4～6mol/L 水溶液中，盐酸胍能够充分抑制细胞和整个组织样品的核糖核酸酶活性。由于其生物学上的破坏特性，常称含有盐酸胍或硫氰酸胍（GTC）的缓冲液为离液缓冲液。

4.5.2 硫氰酸胍

硫氰酸胍（GTC）变性蛋白质的能力比盐酸胍更强。从富含核酸酶组织，尤其是胰脏组织，分离 RNA（Chirgwin 等，1979）时选用 GTC。工作溶液通常是 4mol/L 的 GTC 水溶液，常与还原试剂（如 β-巯基乙醇，即 β-ME）和离子型去污剂（如十二烷基肌酸钠）联合使用。

4.5.3 十二烷基硫酸钠

十二烷基硫酸钠（SDS）是一种离子型去污剂，用来迅速破坏生物膜。由于 SDS 能够迅速破坏组织结构、抑制 RNase 和脱氧核糖核酸酶（DNase）活性，因此 SDS 是很多纯化核酸试剂的关键组分。通常将 SDS 制备成 10%(100g/L) 或 20%(200g/L) 的储备液，常用的 SDS 工作浓度是 0.1%～0.5%。SDS 的纯度能够显著影响该变性剂的功能。在钾盐存在下，SDS 容易沉淀。在高盐离液溶液中 SDS 的溶解度很低，因此在含胍的缓冲液中不加 SDS。

4.5.4 *N*-十二烷基肌氨酸钠

N-十二烷基肌氨酸钠（sarkosyl 或 sarcosyl）与 SDS 类似，是离子型去污剂。与 SDS 不同的是，*N*-十二烷基肌氨酸钠在高盐离液溶液中有很好的溶解性，是含有胍的裂解缓冲液的首选去污剂。*N*-十二烷基肌氨酸钠是这些缓冲液的常用组分。*N*-十二烷基肌氨酸钠能破坏组织和细胞的超微结构，抑制核酸酶活性，促进细胞裂解液的蛋白质和核酸解聚。

4.5.5 苯酚：氯仿：异戊醇

当心 苯酚、氯仿及其混合物是致癌剂，也是腐蚀剂。操作这些试剂时要特别小心。要采取生产厂家提出的所有安全措施。

有机溶剂苯酚和氯仿是非常有效的变性溶剂，能够导致蛋白质沉淀。虽然不稳定，但是分子生物学级的苯酚（经重蒸除去杂质）[1] 是很好的蛋白质变性剂。重蒸后的苯酚不稳定，能被迅速氧化成苯醌，使苯酚溶液变成粉红色。醌产生的自由基能断裂磷酸二酯键并与核酸交联。为了降低苯酚氧化的速度，将 8-羟基喹啉加入到终浓度为 0.1%(1g/L)。通常用含水缓冲液饱和后的苯酚与等体积的氯仿混合，制备成苯酚试剂。氯仿能够稳定苯酚，增加抽提时有机相的密度，提高蛋白质的除去效率，也有利于除去脂类物质。用苯酚：氯仿混合物抽提获得的 poly(A)$^+$ mRNA 的产量，比仅用苯酚抽提所获得的量多（Perry 等，1972）。通常还把异戊醇加入苯酚：氯仿混合物中或氯仿中。异戊醇能减少有机溶剂抽提时所产生的蛋白质泡沫。最常用的抽提试剂是比例为 25∶24∶1（体积比）的苯酚：氯仿：异戊醇。在这些溶剂存在时，RNase 活性被抑制。

附录 3 详细介绍了苯酚的制备。

4.5.6　8-羟基喹啉

8-羟基喹啉是核糖核酸酶的部分抑制剂，它偶尔被加入含有苯酚的有机抽提缓冲液中（Kirby，1956）。8-羟基喹啉作为抗氧化剂能够稳定苯酚，阻止苯醌（酚的氧化产物）的形成。8-羟基喹啉终浓度通常是 0.1%(1g/L)。8-羟基喹啉的加入使苯酚：氯仿呈亮黄色，有助于研究人员进行核酸分离纯化时区分有机相和水相。

8-羟基喹啉也能螯合重金属，在除去细胞裂解液的氧钒核糖核苷复合物时非常有用。与 VDR 结合后，8-羟基喹啉的颜色从亮黄色转化成深绿色。如果抽提的有机苯酚相仍然是黄色，表明所有的 VDR 已经除去。即使不使用 VDR 时，在有机抽提缓冲液中加入 8-羟基喹啉也还是有好处的，因为重金属与 RNA 的长期接触，会导致 RNA 的降解。当然 RNA 研究用的所有试剂必须用高纯度的生化级水溶解制备。

4.5.7　氯化铯

过去氯化铯作为标准的密度梯度介质用于核酸的分析与制备。因为 CsCl 抑制核糖核酸酶的能力有限，必须使用超纯的无核酸酶的 CsCl。如果必要，含有杂质的固体 CsCl 在 200℃烘烤 6～8h 能够除去 CsCl 中残余的 RNase 活性。由于使用更新的树脂和/或硅胶滤器，核酸纯化不再需要使用密度梯度离心，因此 CsCl 作为核酸纯化介质的重要性已经大大降低。

4.5.8　三氟乙酸铯

三氟乙酸铯（CsTFA）是高度可溶性盐。在去污剂不存在的情况下，三氟乙酸铯能够溶解并解离核酸结合的蛋白质。因此 CsTFA（Amersham Biosciences 公司产品）是核糖核酸酶的优秀抑制剂。其应用使研究人员不必用传统的方法（如苯酚：氯仿，蛋白酶 K）就能够去除蛋白质。与 CsCl 比起来，CsTFA 离液特性更强，抑制 RNase 活性的能力更强

[1] 可以从厂家购买重蒸苯酚，这样就不需要在实验室纯化苯酚。尽管在 25 年前实验室广泛使用自己纯化的苯酚，但是苯酚重蒸的危险大，还不如多花点钱直接买分子生物学纯化的苯酚试剂。在实验室蒸馏苯酚很危险，要尽量避免。如果万不得已非得自己在实验室蒸馏苯酚，读者可以参照苯酚的实验室蒸馏方法（Wallace，1987），并且只能让有经验的人员进行苯酚蒸馏。

(Carter 等，1983)，在乙醇中的溶解度更大，而乙醇溶解性大，有助于 RNA 离心沉淀时除去 CsTFA。由于 CsTFA 的密度可达 2.6g/ml，在 CsTFA 中离心可以将 RNA 离心沉淀或呈条带。如同 CsCl，这种方案的主要缺点是要使用超离心，而超离心在目前的分子生物学实验室使用率低。

4.5.9 蛋白酶 K

蛋白酶 K 是一种蛋白裂解酶（丝氨酸蛋白酶），来源于霉菌 *Tritirachium album*。在溶液状态下，蛋白酶 K 在 pH 4.0～12.5 都很稳定，其最适 pH 是 8.0，在 25～65℃都有酶活性（Ebeling 等，1974）。尽管该酶有两个 Ca^{2+} 结合位点，但是缺乏 Ca^{2+} 时，该酶仍能降解核酸抽提液中的蛋白质。偶尔在 EDTA 存在下，蛋白酶 K 于 50℃保温能抑制不稳定的、依赖于 Mg^{2+} 的 RNase 活性。

通常将蛋白酶 K 溶解于水中，制备成 20mg/ml 储备液。这种储备液在－20℃可以稳定保存 1 年。或者将蛋白酶 K 溶于 50mmol/L Tris(pH 8.0)、1mmol/L $CaCl_2$ 中，于－4℃可以稳定保存数月。在一些缓冲系统中，如 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、1mmol/L EDTA、0.5% SDS，蛋白酶 K 工作溶液浓度是 50μg/ml。反应缓冲液中加入 1mmol/L Ca^{2+}，蛋白酶 K 的活性最大。

链霉蛋白酶（pronase）是来源于链霉菌（*Streptomyces griseus*）的蛋白酶，能替代蛋白酶 K。有时需要用链霉蛋白酶自降解系统消除污染的核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶活性。如果需要使用这个系统，只需要简单地将链霉蛋白酶储备液［20mg/ml，溶于 10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、10mmol/L NaCl］在 37℃保温 1h，就制成了链霉蛋白酶自降解系统。直接从厂家购买预先降解了的链霉蛋白酶，在使用前就不需要额外的处理。不管是已经预处理了的，还是自制的链霉蛋白酶储备溶液，都要将溶液分装后保存于－20℃冰箱中。链霉蛋白酶的反应条件和蛋白酶 K 相同，只是该酶的工作浓度推荐值是 1mg/ml 左右。

4.5.10 RNAlater（RNA 保护剂）

从事 RNA 研究的人都知道 RNAlater 是一种专利保护的水溶液，能够保护细胞、组织和器官的 RNA，防止化学因素或 RNase 导致的 RNA 裂解，有利于研究人员处理生物材料，回收高质量的 RNA。RNAlater 的化学特征有助于样品，尤其是室外收集的样品的回收。RNAlater 与植物细胞和组织、动物细胞和组织，以及大肠杆菌兼容性好。

4.6 实验方案：氧钒核糖核苷复合物的合成

这里所介绍的氧钒核糖核苷复合物的合成方案，对 Leinhard 等（1971）、Berger 和 Birkenmier（1979）的合成方案进行了修改。在本实验室将合成 VDR 所需的所有试剂，混合于三颈烧瓶中（图 4.1）。三颈烧瓶置于油浴。三颈用来放置温度计和 pH 探针，并能滴加 NaOH。成比例放大下面的方案，能够制备更多的 VDR。

① 取腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷固体各 0.5mmol，混合后加入 8ml 水。

② 在通风橱中，将核糖核苷混合物置于加热套、沸水浴或油浴加热，直至所有固体溶解。在熟练人员指导下，使用加热套或油浴。不适当的操作或操作粗心，会引起严重的、永

久性伤害。

③ 在通入恒流氮气的情况下，当溶液出现涌出或出气泡时，加入 1ml 2mol/L $VOSO_4$（硫酸氧钒）。

当心　硫酸氧钒高度有毒。

④ 滴加 10mol/L NaOH，使溶液的 pH 维持在 6.0 左右。

⑤ 然后滴加 1mol/L NaOH，使溶液的 pH 达到 7.0。

注意　在 pH 从 6.0 向 7.0 调整时，必须使用 1mol/L NaOH。因为该区间 pH 变化速度很快。

⑥ 在 pH 7.0 时出现氧钒离子（Ⅳ）沉淀。伴随该沉淀的形成，颜色也从亮绿色转化成特征性的暗绿色。

图 4.1　Corning 玻璃公司（Corning，New York）的三颈烧瓶。三颈烧瓶易于添加反应组分、固定 pH 电极和温度计及通入氮气

注意　在氮气缺乏、pH 高于 3.5 的情况下，4 价的氧钒离子会氧化成 5 价的氧钒离子，后者抑制核糖核酸酶的能力很弱。

⑦ 用水将终体积调整到 10ml。

最好　经过简单离心除去新合成 VDR 溶液中的 Na_2SO_4，或者在使用前离心除去 VDR 溶液中的 Na_2SO_4。

⑧ 合成反应的产物是 200mmol/L 氧钒核糖核苷复合物储备液。在充入 N_2 的情况下分装，在－20℃可以储存 1～2 个月，在－70℃至少可以储存 1 年。

4.7　参考文献

Benecke, B. J., Ben-Ze'ev, A., and Penman, S. (1978). The control of mRNA production, translation, and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* **14,** 931.

Berger, S. L. (1975). Diethyl pyrocarbonate: An examination of its properties in buffered solutions with a new assay technique. *Anal. Biochem.* **67,** 428.

Berger, S. L., and Birkenmier, C. S. (1979). Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. *Biochemistry* **18,** 5143.

Berger, S. L., Hitchcock, M., Zoon, K. C., Birkenmier, C. S., Friedman, R. M., and Chang, E. H. (1980). Characterization of interferon messenger RNA synthesis in Namalva cells. *J. Biol. Chem.* **255,** 2955.

Blackburn, P. (1979). Ribonuclease inhibitor from human placenta: Rapid purification assay. *J. Biol. Chem.* **254,** 12484.

Blackburn, P., and Moore, S. (1982). Pancreatic ribonuclease. In "The Enzymes" (P. D. Boyer, Ed.), 3rd ed., pp. 317–433. Academic Press, New York.

Blackburn, P., Wilson, G., and Moore, S. (1977). Ribonuclease inhibitor from placenta. *J. Biol. Chem.* **252,** 5904.

Blade, W. H., and Boulton, R. (1988). Absorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Vitic.* **39(3),** 193.

Blumberg, D. D. (1987). Creating a ribonuclease-free environment. *Methods Enzymol.* **152,** 20.

Carter, C., Britton, V. G., and Haff, L. (1983). CsTFA: A centrifugation medium for nucleic acid isolation. *BioTechniques* **1,** 142.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18,** 5294.

Cox, R. (1979). Quantitation of elongating form A and B RNA polymerases on chick oviduct nuclei and effects of estradiol. *Cell* **7,** 455.

Dahle, C. E., and Macfarlane, D. E. (1993). Isolation of RNA from cells in culture using Catrimox-14 cationic surfactant. *BioTechniques* **15,** 1102–1105.

de Martynoff, G., Pays, E., and Vassart, G. (1980). Synthesis of a full length DNA complementary to thyroglobulin 33S mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **93,** 645.

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., and Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* limber. *Eur. J. Biochem.* **47,** 91.

Ehrenberg, L., Fedorcsak, I., and Solymosy, F. (1974). Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **16,** 189.

Fraenkel-Conrat, H., Singer, B., and Tsugita, A. (1961). Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* **14,** 54.

Henderson, R. E. L., Kirkegaard, L. H., and Leonard, N. J. (1973). Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. Adenosine-containing nucleotides and dinucleoside phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* **294,** 356.

Kirby, K. S. (1956). A new method for isolation of ribonucleic acids from mammalian tissue. *Biochem. J.* **64,** 405.

Leinhard, G. E., Secemski, I. I., Koehler, K. A., and Lindquist, R. N. (1971). Enzymatic catalysis and the transition state theory of reaction rates: Transition state analogs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36,** 45.

Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: poly(A$^+$) nuclear sequences are conserved and poly(A$^+$) addition precedes splicing. *Cell* **15,** 1477.

Palmiter, R., Christensen, A., and Schimke, R. (1970). Organization of polysomes from pre-existing ribosomes in chick oviduct by a secondary administration of either estradiol or progesterone. *J. Biol. Chem.* **245,** 833.

Perry, R. P., La Torre, J., Kelley, D. F., and Greenberg, J. R. (1972). On the lability of poly(A) sequence during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* **262,** 220.

Poulson, R. (1973). Isolation, purification, and fractionation of RNA. *In* "The Ribonucleic Acids" (P. R. Stewart and D. S. Letham, Eds.), pp. 243–261. Springer-Verlag. New York.

Saywell, L. G. (1934). Clarification of wine. *Ind. Eng. Chem.* **26,** 981.

Scheele, G., and Blackburn, P. (1979). Role of mammalian RNase inhibitor in cell-free protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76,** 4898.

Scheider, R., Schneider-Scherzer, E., Thurnher, M., Auer, B., and Schweiger, M. (1988). The primary structure of human ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI) discloses a novel, highly diversified protein superfamily with a common repetitive module. *EMBO J.* **7,** 4151.

Sela, M., Anfinsen, C. B., and Harrington, W. F. (1957). The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **26,** 502.

Wallace, D. M. (1987). Large- and small scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* **152,** 33.

（刘建华译；金由辛校）

第5章 RNA分离策略

5.1 基本原理

根据经验已建立了行之有效的RNA分离方法学。必须细察RNA的分离技术，并不断地对其进行优化。用这些RNA分离方法，通常能够获得细胞质RNA、细胞核RNA或者是细胞质和细胞核混合的RNA。通常将细胞质和细胞核混合的RNA称为细胞RNA。细胞的裂解就是RNA分离操作的第一步。裂解细胞的缓冲液可以分成两大类。①细胞裂解缓冲液中含有苛刻的离液试剂，如胍盐、十二烷基硫酸钠（SDS）、*N*-十二烷基肌氨酸钠（sarcosyl）、尿素、苯酚或氯仿。其离液试剂能够破坏细胞膜和亚细胞器官，同时使核糖核酸酶失活。②细胞裂解缓冲液温和地溶解细胞膜，但能够保持细胞核的完整，如低渗Nonidet P-40[1]（NP-40）裂解缓冲液[2]。通过分级离心，可以从裂解混合物中除去完整的细胞核、其他细胞器和细胞残渣。这个方案的可靠性取决于裂解缓冲液中添加的RNase抑制剂，以及在分离、储存RNA时操作的仔细程度。值得注意的是，对已经建立的几个抽提RNA的基本技术有各种各样的修改。例如，有些技术不分离总RNA，而是直接从细胞裂解液中分离poly(A)$^+$ RNA。

细胞裂解后，分离的细胞核RNA或细胞质RNA属于稳态RNA。它代表了这个时间点的细胞或亚细胞器RNA的积累。特殊的稳态RNA丰度代表了特异的基因表达调节。但是从RNA分子的丰度不能了解该RNA分子转录合成的速度，也不能了解该RNA分子在细胞内的半衰期，即稳定性。这是仅采用稳态RNA进行研究的主要缺点。很明显，细胞对环境变化的生化应答，不仅仅表现在转录速率的改变，也表现在前体RNA的加工效率、细胞核向细胞质运输的效率、细胞质RNA的稳定性、信使RNA的翻译效率等。与本章提出的稳态转录产物分析不同，转录速度研究需要分离完整的细胞核。对于那些细胞裂解时开始转录的RNA分子，完整的细胞核能够继续支持RNA分子的延伸，并将标记掺入到合成的RNA分子中。这类技术统称为核逃逸实验（nuclear runoff assay）（Marzluff和Huang，1984），它有利于保持细胞核的天然结构，并能够标记转录已经起始的RNA分子（见第17章核逃逸实验）。

---

[1] Nonidet P-40是这个非离子型去污剂的一个较老的称呼，现在没有厂家提供这个去污剂。Igepel CA-630（Sigma Cat. I-3021）在化学上与NP-40不同，但能够替代NP-40。

[2] 尽管渗透裂解是最温和的裂解细胞方式之一，但是如果细胞有富含糖的细胞壁，渗透裂解的用处不大。有些细菌、霉菌和植物细胞有这样的细胞壁，必须用适当的方法破碎细胞壁后才可以用渗透方法裂解细胞。

5.2 RNA 纯化的目的

在 RNA 分离策略的设计过程中，首先要确定的因素是细胞裂解的方法。这取决于研究人员是要确定 RNA 含量，还是 RNA 的亚细胞分布。同样重要的是，要确定抑制核糖核酸酶活性的方法。例如研究人员可能想确定基因表达的调节是在转录水平上进行，还是在转录后水平上进行。此时细胞破碎以及后续的 RNA 分离方法必须能够独立分析细胞质的 RNA 丰度和细胞核的 RNA 丰度。要使最终 RNA 制剂所得到的数据是有价值的，RNA 的纯化策略就必须满足研究的特殊目标。

在讨论 RNA 分离的目的之前，首先要对大家所研究的 RNA 进行归类。这些归类列于表 5.1 中。研究人员在拿起微量移液器进行 RNA 分离之前，首先要弄清楚各个分离方法所针对的 RNA 种类。

表 5.1 真核 RNA 的亚群

mRNA 亚群	组　成
细胞总 RNA	细胞所有的 RNA
细胞质总 RNA	除了线粒体 RNA 外的细胞质 RNA
细胞 poly(A)$^+$RNA	细胞核和细胞质的多腺苷酸 RNA
细胞质 poly(A)$^+$RNA	细胞质的多腺苷酸 RNA
poly(A)$^-$RNA	非多腺苷酸 RNA(常常是 rRNA 和 tRNA)
mtRNA	线粒体 RNA
cpRNA	叶绿体 RNA(仅出现于植物)
核 RNA	从完整细胞核获得的转录产物(含有成熟的和不成熟的)
mRNA	已经加工成熟并被运输到细胞质的 poly(A)$^+$和 poly(A)$^-$RNA

目标 1：选择合适的细胞膜溶解方法。细胞裂解的方法决定了样品亚细胞器破坏的程度。例如，能够成功地裂解组织培养细胞的裂解缓冲液可能完全不适宜于整个组织样品的裂解。同样重要的是，膜溶解的方法也决定了是否需要增加操作从制备的 RNA 样品中去除 DNA，能否独立纯化细胞核 RNA 和细胞质 RNA。尽管很容易从 RNA 样品中除去 DNA，但是如果细胞核和细胞质 RNA 同时纯化，就很难确定总 RNA 中有哪些是细胞核的，哪些是细胞质的。裂解方法必须与 RNA 纯化后的应用兼容。记住在设计 RNA 纯化方案时，首先要考虑纯化后的 RNA 在后续的操作中是否有用和纯化 RNA 能否解决所要研究的问题。

目标 2：保证能够抑制所有核糖核酸酶。无论是从个人经验还是从第 4 章的讨论中，知道在分离 RNA 时必须抑制所有的 RNase 活性。要抑制的 RNase 包括试剂中的 RNase、器皿的 RNase 和细胞裂解液的 RNase 活性。尽管有些裂解试剂自身能够抑制 RNase 活性，但是其他的细胞裂解试剂需要添加额外的 RNase 抑制剂来保护分离过程中的 RNA 分子。还有，首先必须证实抑制或消除 RNase 活性的操作与裂解缓冲液是兼容的。

目标 3：选择一种方法去除样品蛋白质。在分离 DNA 和 RNA 时，完全除去细胞裂解液的蛋白质非常重要。核酸忠实杂交和核酸准确定量需要仔细除去核酸样品中的蛋白质。例如，残留的蛋白质，尤其是组蛋白，能够抑制双链 DNA 的限制性酶切。而且“脏”RNA 会强烈抑制反转录（第 18 章）和聚合酶链反应（PCR）扩增（第 19 章）。可以用下列方法除去蛋白质。

① 用蛋白酶 K 处理。

② 用有机溶剂混合物如苯酚和氯仿反复抽提。

③ 在含有胍的缓冲液中溶解。

④ 盐析除去蛋白质。

⑤ 上述方法任意组合除去蛋白质。

任何除去蛋白质的方法都是控制 RNase 活性的有效手段。要记住，一旦蛋白质变性剂从样品中除去，RNA 样品对 RNase 降解非常敏感。当 RNA 简单溶于无变性剂的缓冲液时，对核酸酶最敏感。

目标 4：选择核酸浓缩的方法。多数 RNA 纯化的最后一步是核酸浓缩。最通用的核酸浓缩方法是用不同组合的盐和乙醇将核酸进行沉淀（表 5.2）。例如，常加入 0.1 倍体积 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）到核酸样品中，然后加入 2.5 倍体积的 95%～100%的乙醇。核酸和盐相互作用，降低了核酸在乙醇和异丙醇中的溶解度，使核酸从溶液中沉淀出来。而且不同盐和乙醇组合，核酸的沉淀速率依赖于温度。与基因组 DNA 快速沉淀不同，RNA 沉淀慢多了，常需要在－20℃放置较长时间，以保障核酸的充分回收，尤其是后面介绍的 NP-40 方法。这种现象是基因组大、结构复杂，则沉淀快；而 RNA 小、结构简单，则沉淀慢。浓缩核酸样品的其他方法❶，包括商家提供的浓缩装置、透析和真空浓缩使用频率低，因为这些方法的成功率取决于研究人员的个人经验。而使用盐和乙醇沉淀核酸，操作简单，成功率高，使用广泛。新近建立的硅胶纯化核酸的技术不用盐或乙醇，洗脱下来的 RNA 已经浓缩，能够马上使用。

表 5.2　核酸沉淀[①]用盐和醇的组合

盐	储存浓度	沉淀用量	沉淀用终浓度
NaAc	3mol/L，pH 5.2	0.1 倍体积	300mmol/L
NaCl	2mol/L	0.1 倍体积	200mmol/L
LiCl[②]	8mol/L	0.1 倍体积	800mmol/L
NH_4Ac[③]	10mol/L	0.2 倍体积	2mol/L
KAc	2.5mol/L	0.1 倍体积	250mmol/L
Glycogen[④]	10mg/ml	0.01 倍体积	100μg/ml
醇	加入盐后所要加入的醇量		
乙醇(95%～100%)	2.2～2.5 倍体积		
异丙醇(100%)	0.6～1.0 倍体积		

① 沉淀阈值：DNA 50ng/ml；RNA 100ng/ml。如果核酸浓度低于阈值，则沉淀效果不佳。

② 氯化锂不能与核酸共沉淀。如同 NaCl，LiCl 在乙醇中的溶解度很大。如果分离的 RNA 要进行反转录，就不要用 LiCl，否则就要沉淀两次除去过量的 LiCl。

③ 选用 NH_4Ac 沉淀 cDNA。在这种溶液中，没有掺入的单核苷酸不被沉淀，因此简单沉淀能够除去游离的核苷酸。

④ 使用 Glycogen 要谨慎，因为过量的 Glycogen 会抑制一些体外反应。

目标 5：选择合适的储存条件保存纯化的 RNA。由于 RNA 天生的不稳定性，储存方式不正确将使纯化的 RNA 样品迅速降解。人们提出了很多方案储存 RNA 和 DNA，涉及储存的温度、缓冲液和储存形式。本章 5.10 节对 RNA 样品储存进行了讨论。

❶ 一个较老的浓缩核酸的方法是用丁醇反复抽提。不推荐大家使用这个方法，因为很难从核酸样品中彻底除去残余的丁醇。

5.3 裂解缓冲液的组成

每人都有一个自己中意的 RNA 分离方法，也有很多商家提供分离 RNA 的产品，这些产品对 RNA 分离方法进行了很多修改。根据细胞破损程度和核糖核酸酶被抑制的情况可以将这些方案分为两类，即温和的裂解缓冲液和剧烈的裂解缓冲液。这两种方案所获得的 RNA 都可用于基因表达研究，但是各自都有一定的局限性。如同后面的章节要讨论的，要记住最重要的事情是没有一种“正确的”方法适宜于从细胞或组织中抽提 RNA，但是“唯一的”错误方式是在操作过程中引入核糖核酸酶活性。

5.3.1 温和的裂解缓冲液

由非离子型、低渗缓冲液介导的细胞裂解不会损伤大多数亚细胞器。裂解缓冲液中含有 NP-40（Favaloro 等，1980）和 $MgCl_2$ 有利于细胞质膜溶解，但能够保持细胞核的完整性。因此，用含有 NP-40 的裂解液起始细胞裂解，细胞质 RNA 就不会与细胞核 RNA 混合。在这种方案中，分级离心很容易除去完整的细胞核、较大的细胞器和细胞残渣。所获得的细胞质上清液富含细胞质 RNA 和蛋白质，蛋白质可以用有机溶剂混合物苯酚/氯仿进行一系列抽提除去。这种策略的明显优点是最后沉淀回收的 RNA 仅仅代表细胞质 RNA，在研究基因调节水平方面可能有特别的意义。

这种方法分离 RNA 的缺点是这种裂解缓冲液本身离液能力不够，不能完全抑制或破坏 RNase 活性。记住在细胞裂解时，受隔离的 RNase 活性将突然释放，即使努力地分离 RNA，这些核糖核酸酶活性将损伤 RNA 的完整性。因此，在使用前裂解缓冲液中必须加入一些 RNase 抑制剂来控制核糖核酸酶活性。采用这种策略分离 RNA 时，除了分离方法特别标明外，所有操作在冰上进行将非常有用。预先冷却将要使用的试剂和试管也很有用。假如想利用含胍溶液的裂解特性（后面讨论），并且要分开各个亚细胞器 RNA，一个值得尝试的策略是先用含有 NP-40 的缓冲液裂解细胞，回收完整的细胞核，然后用含胍的缓冲液裂解细胞核；这样可以用回收细胞总 RNA 的方法来回收细胞核 RNA 或细胞质 RNA，这种方法尤其适合于细胞核 RNA 的分离。此处介绍了含胍缓冲液回收 RNA 的方案，第 17 章将详细介绍细胞核 RNA 的分离。

5.3.1.1 实验方案：用含有 NP-40 的低渗裂解缓冲液分离细胞质 RNA

该方法的基础是利用非离子型、低渗缓冲液溶解细胞质膜，但能保持细胞核的完整性[1]。除去细胞核的上清液可以用来分离细胞质 RNA，而回收的完整细胞核可以用来纯化细胞核 RNA（在第 17 章有详细介绍）。根据个人记录，有人使用这种方法，在不使用核糖核酸酶抑制剂的情况下，获得了非常高质量的 RNA。细胞的裂解在冰上进行，速度要尽可能快。此处介绍了作者使用的一个改进方法（图 5.1）。如果使用 RNase 抑制剂，RNase 抑制剂应该一直维持到苯酚/氯仿混合物加入，后者能够除去溶液中的蛋白质。最后用广泛使用的制备技术，即乙醇沉淀回收 RNA。与早先建立的含胍溶液分离 RNA 的方法相比，这种方法不需要超离心，而且速度快。但是这种方法却比新近建立的酸-酚法（后面介绍）费时。这是由于这种方法要求操作温和，避免细胞核裂解。但是避免细胞核裂解的温和操作又

[1] 由于细胞和细胞器对于去污剂、盐和 RNase 抑制剂的敏感性不同，研究人员可以根据经验优化裂解条件。

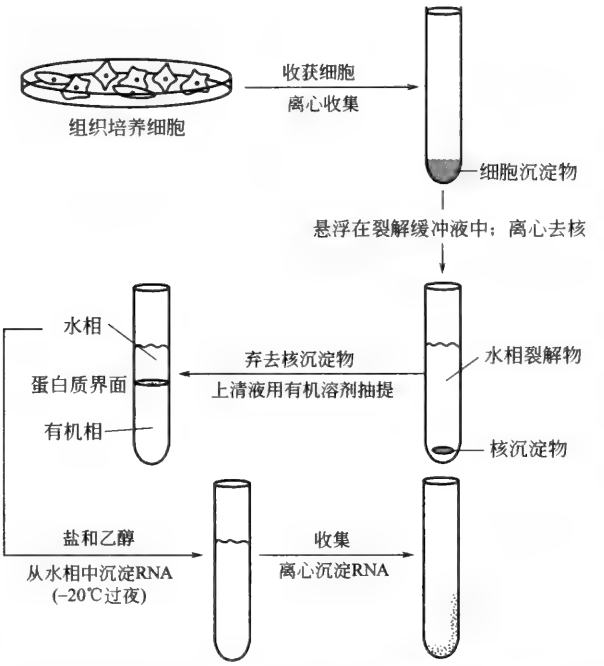


图 5.1　用含有 NP-40 的低渗裂解液制备细胞质总 RNA。尽管这种方法适合于培养细胞，但是组织样本预先温和匀浆处理后也可以用这种方法制备细胞质总 RNA

在一定程度上增加了 RNase 降解 RNA 的危险性。尽管用含胍的缓冲液裂解能够获得较高质量的 RNA，但是此处所介绍的方法分离的 RNA 能够满足大多数 RNA 试验。这种方法最适合培养细胞，而全组织样本的裂解效果比培养细胞裂解效果差。对于全组织样本而言，先用 Dounce 匀浆器温和匀浆全组织样本（要避免细胞膜的严重损伤），然后用这种方法处理可能会产生更好的效果。

(1) 预先：制备抽提缓冲液

苯酚的氧化会严重影响制备 RNA 的质量，因此分离 RNA 前要制备足量新鲜的抽提缓冲液（图 5.2）。

① 在 60℃ 熔化重蒸苯酚（分子生物学级），并用等体积 Tris-SDS 缓冲液饱和（图 5.2A.）：

100mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

10mmol/L Tris，pH 8.5

0.5% SDS[1]

② 氯仿：异戊醇混合物（24∶1）（图 5.2B.）与等体积 Tris-SDS 饱和的苯酚混合。混合溶液就是抽提缓冲液（图 5.2C.）。

[1] SDS 的加入保证有机溶剂抽提时能够高质量地回收水相 poly(A)$^+$ RNA。由于 SDS 的存在，有机相和水相的分配依赖于 pH，苯酚要用 Tris-SDS 饱和。在加入 SDS 前，Tris 缓冲液（100mmol/L NaCl，1mmol/L EDTA，10mmol/L Tris，pH 8.5）必须经过高温灭菌。

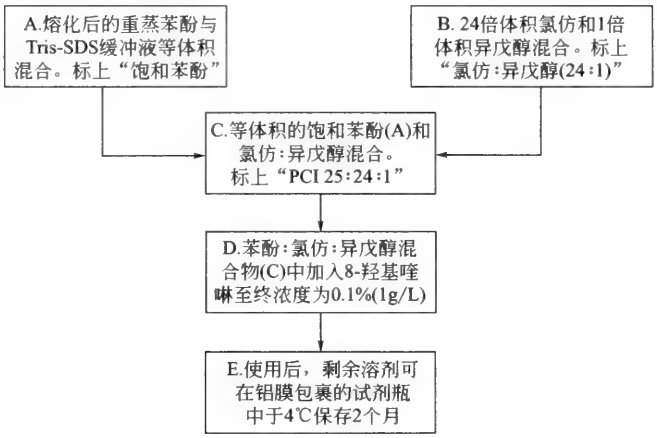


图 5.2　用于 NP-40 分离细胞质 RNA 的有机抽提试剂的制备方法。苯酚用 Tris-SDS 缓冲液饱和，而不是仅仅用 Tris 饱和。8-羟基喹啉的加入使抽提试剂除去蛋白质的性能更佳。当实验方案中标明要使用苯酚：氯仿：异戊醇时，多数情况下可以使用本法制备的含有 8-羟基喹啉的苯酚：氯仿：异戊醇溶液

③ 最后抽提缓冲液中加入 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%。让溶液分相。

例如，20ml 熔化的重蒸苯酚与 20ml Tris-SDS 缓冲液混合，形成 40ml Tris-SDS 饱和的苯酚，加入 40ml（等体积）氯仿：异戊醇（24：1）混合物。所形成的溶液就是抽提缓冲液。加入 0.08g 8-羟基喹啉（终浓度为 0.1%，即 1g/L）能够增强这种抽提缓冲液的稳定性。这种溶液在 100ml 玻璃试剂瓶中在 4℃可以保存 6～8 周。不使用时最好将瓶子用铝膜包裹，尤其是在每天都要开关数次的冰箱中储存时。

当心　*所有有机溶剂的操作必须在通风橱中进行，而且必须对眼睛和皮肤进行适当的防护。必须根据国家有关规定处理有机废物。*

(2) RNA 分离

① 戴手套!

② 将组织培养细胞离心收集到预先冷却到 4℃的合适的离心管中。

注意　附录 10 介绍了胰蛋白酶处理方案。

③ 在冰冷却的裂解缓冲液中温和而又充分地悬浮沉淀细胞。缓冲液组成是：

140mmol/L NaCl

1.5mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L Tris-Cl，pH 8.5

0.5% NP-40[1]

最好加入 10mmol/L 氧钒核糖核苷复合物（VDR）[2]

10^6 个细胞至少要用 100μl 裂解缓冲液。在冰上保温 5min，期间周期性地倒置试管有助于细胞裂解。

注意 1　VDR 会迅速氧化，因此只在缓冲液使用前才将 VDR 加入裂解缓冲液中。通常 VDR 的制备

[1] 在加入 NP-40 之前，裂解缓冲液要高压消毒。

[2] 参阅第 4 章氧钒核糖核苷复合物合成、优点和缺点。

和储备液浓度是 200mmol/L，使用时的工作浓度是 5～20mmol/L。另外也可以将 Promega 公司的 RNasin 加入到裂解缓冲液中（终浓度是 250～1000U/ml）抑制 RNase 活性。此外，除了特别指明的条件外，含有 RNA 的试管必须放置在冰上。

注意 2　取出 1μl 裂解液置于载玻片上。在显微镜下检测细胞的裂解程度，检测裂解液中完整细胞和游离细胞核。

④ 在 4℃分级离心 5min，沉淀细胞核和细胞残渣。微量离心机 5000×g 离心，或者采用其他类型的离心机在合适的离心力下离心。

注意 1　尽管 500×g 的离心力就能够沉淀细胞核，但是增加离心力能够完全除去大细胞器，压紧沉淀的细胞核。该离心能够除去基因组 DNA 和细胞核 hnRNA，有助于细胞核外 RNA 的分析。

注意 2　如果后续研究要用到细胞核，例如分离 hnRNA 或基因组 DNA，在 500×g 离心收集细胞核，根据需要延长离心时间。第 17 章对此进行了详细介绍。

⑤ 将上清液（细胞质）转移到新的无 RNase 的试管中，加入 EDTA 到终浓度为 10mmol/L。

注意　通常将 Na_2-EDTA 制备成 500mmol/L 储备液。EDTA 的加入能够防止 Mg^{2+} 介导的核酸间聚合及核酸与蛋白质之间的聚合。

⑥ 加入等体积的有机抽提液（下面一层的黄色液体）到水相细胞质裂解物中。非常小心地倒置混合 15s 或更长时间。样品在 55℃保温 5min。

注意 1　如果液体在微量离心管中，将管置于拇指和食指之间倒置几次，使有机相和水相充分混合，蛋白质充分变性，溶液向外溅出的可能性最小。

注意 2　加热有利于更彻底地除去样品中的蛋白质。有人不加热处理样品，而是增加有机溶剂抽提次数。此处推荐的方案能够减少有机废物的体积。

注意 3　与 VDR 接触后，黄色的 8-羟基喹啉变成深绿-黑色。这是由于 8-羟基喹啉螯合了重金属离子钒。缺乏 8-羟基喹啉或 VDR 时，则没有颜色变化。

⑦ 样品在冰上放置或冰水浴 5min。

注意　快速冷却有利于有机相和水相的分离及 RNA 在水相的分配。

⑧ 在台式离心机中以 500×g～2000×g 或者最大速度离心，分离有机相和水相。

注意　离心分相所需的时间取决于试管的体积和大小。通常最多只需要 5min。尽管多数情况下使用冷冻离心，但是冷冻对于此步分相而言不是必需的。

⑨ 仔细地将上层水相转移到新的无 RNase 的离心管中。要特别小心，不要干扰蛋白质层。因此，最好是留下几微升水相以免界面的蛋白质被转移到新的离心管中（图 5.1）。

⑩ 水相中加入等体积的新鲜抽提溶液，仔细倒置使水相和有机相彻底混合。在 4℃，500×g～2000×g 或台式离心机的最大离心速度离心，分离有机相和水相。通常这步有机溶剂抽提不需要加热或冷却。

⑪ 仔细取出上层水相，转移到无 RNase 的新离心管中。如果有明显的蛋白质层或水相呈云雾状，重复步骤⑩的有机抽提直到蛋白质界面消失，水相透明。

注意　如果大量细胞溶于相对小体积的缓冲液中，通常需要增加有机溶剂抽提次数。

⑫ 最后，水相再用等体积氯仿或氯仿：异戊醇（24∶1）抽提一次以上，倒置使有机相和水相彻底混合。离心 30s 将两相分开。

注意　由于苯酚在氯仿中溶解度高，最后用氯仿抽提能够除去水相残余的微量苯酚。在所有涉及使

用苯酚的场合，最后用氯仿抽提除去水相残余苯酚是一种标准化操作。记住痕量的苯酚也会氧化成醌，后者会影响核酸质量。

⑬ 将水相（上层）转移到新的无 RNase 的试管中，加入 0.1 倍体积 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）和 2.5 倍体积的冰冷冻的 95%乙醇。倒置混匀。

⑭ 在－20℃放置过夜沉淀 RNA。

注意 沉淀核酸时可以用不同的盐和醇组合。在高浓度醇中核酸复合物的溶解度降低。这种沉淀可以用离心收集，干燥后悬浮于适量的缓冲液中。由于不同生物样本所含有的 RNA 量不清楚，在－20℃放置过夜沉淀样品，能保证 RNA 的全面回收。

⑮ 离心沉淀回收 RNA，用 Corex 玻璃离心管，在 4℃、9000×g 离心 30min；或者用微量离心管，在 4℃或室温用台式离心机以最大离心速度离心 10min。

⑯ 倒去乙醇上清液。用 70%～75%乙醇洗涤 RNA 沉淀 2～3 次，除去共沉淀的盐。在 70%～75%乙醇中，盐（特别是乙酸钠）能够溶解，但不能溶解沉淀的核酸。

⑰ 试管用空气简单地干燥。如果需要，最后用 95%乙醇洗涤有利于 RNA 样品干燥。RNA 样品最好以乙醇沉淀的形式保存在－70℃，或者定量后溶于适量缓冲液中分装，－70℃保存（避免反复冻融）。10^7 个细胞可以产生 75～100μg RNA，具体产量取决于细胞种类。

5.3.2 离液裂解缓冲液

至今可能还没有什么方案抑制 RNase 的效果比用含胍盐的缓冲液裂解细胞抑制核 RNase 的效果更好（Chirgwin 等，1979）。胍盐缓冲液彻底解除蛋白质空间结构，因此核糖核酸酶水解 RNA 的能力丧失。离子型变构剂 sarkosyl（后面的章节讨论）能够加强胍盐变性蛋白质的能力。在这种裂解缓冲液中不需要添加其他的核糖核酸酶抑制剂。使用这样的裂解缓冲液抽提 RNA 可以在室温下操作。由于这些裂解缓冲液具有强离散性（即生物学破坏性），在破坏细胞质膜的同时细胞器官也被破坏。因此，细胞核中的基因组 DNA、核不均一 RNA(hnRNA)、线粒体 DNA 和 RNA，都与细胞质 RNA 一道纯化出来。需要除去回收样品中的 DNA。早先多用氯化铯梯度（Glisin 等，1974；Ullrich 等，1983）或三氟乙酸铯梯度（Zarlenga 和 Gamble，1987）之类的等密度离心（背景知识见 Cooper，1977）。由于 DNA 密度是 1.5～1.7g/ml，RNA 的密度是 1.8～2.0g/ml，可以用等密度分离。为了方便读者，附录 9 介绍了作为分子生物学工具的离心技术基础。

最近建立的胍-酸-酚抽提技术，能差异分配 DNA、RNA 和蛋白质（Chomczynski 和 Sacchi，1987），已经成为最常用的快速纯化 RNA 的技术。研究人员充分利用在酸性 pH 环境及有机溶剂中 RNA 和 DNA 之间显著的化学差异，建立了很多快速方法从生物样品中有效分离 RNA、DNA（和蛋白质）（Majumdar 等，1991；Chomczynski，1993）。随后介绍了一些这样的方法和其他的方法。

用离液试剂分离 RNA 的方法，其主要缺点是不能区分细胞质 RNA 和细胞核 RNA。一旦细胞核不均一 RNA（hnRNA）和剪接后成熟的 mRNA 混合，就无法将这两种 RNA 分开（根据大小可以将这两种 RNA 部分分开，但并不适合所有 RNA）。

遗憾的是，很多不严谨的研究人员在使用胍盐缓冲液抽提 RNA 时忽视了保证缓冲液和器皿无 RNase 污染的要求。尽管在胍盐缓冲液存在的情况下 RNase 活性被彻底抑制，但是一旦除去了去污剂，纯化的 RNA 对 RNase 降解又非常敏感。因此，要根据第 4 章介绍的指

导原则，一直避免 RNase 对 RNA 的破坏。

5.4　用含有胍离子的缓冲液分离 RNA

含有异硫氰酸胍或盐酸胍的裂解缓冲液能够重复性地产生高质量的 RNA。这归因于这种试剂非常高的离液特性，属于最强的蛋白质变性试剂（Cox，1968；Nozaki 和 Tanford，1970；Gordon，1972）。从整个组织样品中回收 RNA 就离不开胍盐缓冲液。当细胞质膜被溶解时，细胞核和其他细胞器官也遭到破坏，结果回收的核酸包括细胞核 RNA、细胞核基因组 DNA 和细胞质 RNA。β-巯基乙醇（β-ME）的加入可能促进蛋白质变性（包括核糖核酸酶变性），该还原试剂能够断裂分子内的二硫键，并需要加入其他的 RNase 抑制剂。另一个常用的还原试剂，即二巯基苏糖醇（DTT），能够与胍盐反应，因此胍盐缓冲液中不可以加入 DTT。

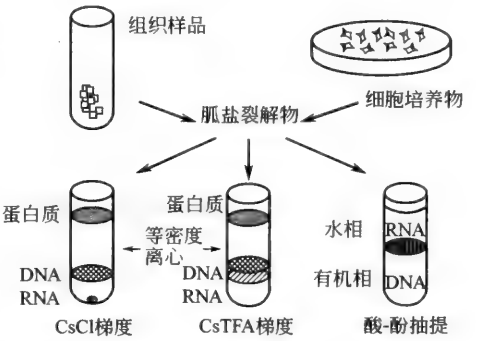


图 5.3　用胍盐缓冲液裂解细胞后，细胞总 RNA 分级的方法：氯化铯（CsCl）或三氟乙酸铯（CsTFA）超离心，或者酸-酚抽提

目前有三个基本方案利用胍盐裂解缓冲液分离裂解液的 RNA、DNA 和蛋白质。此处对每种方案列出了一个例子。这些途径涉及所有细胞裂解后，等密度超离心或酸-酚抽提（图 5.3）。尽管常常能够将 RNA 从含胍的缓冲液中直接沉淀出来，但是用 CsCl 或 CsTFA 超离心能够获得超纯 RNA（尽管繁琐）。对于多数分子生物学应用而言，并不需要采用这种费时的梯度离心方法纯化 RNA。

当心　如果你不熟悉超离心的正确操作，你一定要请求适当的技术协助。如果使用不当，转头会致命。

温和 NP-40 方法有利于细胞质总 RNA 分离，但是用含有胍盐的裂解缓冲液回收的 RNA 是细胞总 RNA（包括细胞质 RNA 和细胞核 RNA）。图 5.4 比较了细胞质总 RNA 和细胞总 RNA 的大小分布。

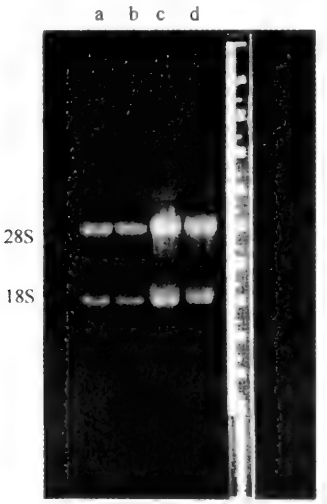


图 5.4　细胞总 RNA 和细胞质总 RNA 大小分布比较。孔 a 和孔 b：20μg 细胞质总 RNA（NP-40 裂解缓冲液分离的，经过苯酚：氯仿抽提除去蛋白质的 RNA 样品）。孔 c 和孔 d：25μg 细胞总 RNA（胍-酸-酚抽提获得）。孔 c 和孔 d 中，在 28S rRNA 条带上面，可见分子量更高的 RNA，即 hnRNA。在上样孔 c 和孔 d 中有明显的荧光，提示有少量的 DNA 污染。电泳图谱用 DS-24 照相机，用 Polaroid 667 成像。荧光标尺是 Diversifield Biotech. Inc. 的产品

5.5 胍-酸-酚抽提技术

毫无疑问，使用离液裂解缓冲液抽提 RNA 能够获得最高质量的 RNA。含胍的缓冲液是最有效的离液缓冲液。如同前面所介绍的，离液缓冲液能够迅速彻底地破碎培养的细胞或组织的细胞，同时能够迅速地消除 RNase 活性（即使 RNase 含量非常丰富）。原先的方案利用 DNA 和 RNA 密度差异，用超离心将 RNA 与 DNA 分开，非常费力。1987 年 Chomczynski 和 Sacchi 介绍了一种纯化完整 RNA 的方法，用含有异硫氰酸胍的裂解缓冲液处理细胞，样品不用 CsCl 超离心。在这个方法和相关的方法中，酸-酚抽提含胍盐的细胞或组织裂解液能够迅速分离 RNA；氯仿的加入有利于水相和有机相的分离。在实验室将水饱和的苯酚与酸性乙酸钠溶液混合就能够制备出这种抽提用的酸-酚，预先混合的苯酚和异硫氰酸胍单相溶液（例如，TRIzol 和 TRI 试剂）可以从一些商家购买。厂家提供的这些试剂对起初发表的实验方案进行了改进。相分离时，RNA 留在水相，而 DNA 和蛋白质留在蛋白质界面层和有机相中。然后，用异丙醇沉淀和离心回收水相 RNA 分子。这种方法在 1h 内能够从少至 10^6 个细胞或 1mg 组织中有效地分离出 RNA。

5.5.1 实验方案：胍-酸-酚抽提

① **戴手套！**

② 离心收集细胞，将 10^6 个细胞悬浮在 100μl 溶液 D 中。

4mol/L 异硫氰酸胍

25mmol/L 柠檬酸钠，pH7.0

0.5% *N*-十二烷基肌氨酸钠（sarcosyl）

100mmol/L 2-巯基乙醇

用微量移液器枪头来回吸取排出或者温和地涡旋直至完全破碎细胞沉淀。

注意 每 100mm 组织培养皿中直接加入 1.0～1.5ml 溶液 D 可以将细胞直接裂解。在培养皿或烧瓶中直接裂解细胞需要的裂解试剂较多，因溶液黏度高很难回收所有的裂解液。此时，用无菌的细胞 scraper（Corning；货号 3010）可能有用。体积缩小后，整个操作可以在 2.2ml 的微量离心管中进行。

③ 将匀浆液转移到聚丙烯管中。步骤②使用的溶液 D 裂解缓冲液中每毫升加入：

0.1ml 2mol/L 乙酸钠，pH 5.2

1.0ml 水饱和的苯酚（分子生物学级）

0.2ml 氯仿：异戊醇

每加入一种试剂后，盖紧盖子，来回倒置仔细而又充分混合。所有试剂加入后剧烈混合 30s。

④ 样品在冰上至少冷却 15min。在 4℃离心分相。

⑤ 将含有 RNA 的水相转移到一个新管中，加入 0.75 倍体积冰冻的异丙醇。－20℃放置 1h 以上沉淀 RNA。

注意 操作规模大时，使用有螺旋盖的玻璃管。离心时将玻璃管置于适当的套子中沉淀回收 RNA。

⑥ 在 4℃以 10000×g 离心 20min，收集沉淀。仔细倒出上清液，丢弃。

当心 该方案中所有离心的离心力不得超过离心管所能耐受的最大离心力。

⑦ 将 RNA 沉淀彻底溶于 300μl 溶液 D 中（见步骤②），转移到 1.7ml 无 RNase 的微量离心管中。

⑧ 加入 0.75 倍体积冰冻的异丙醇。－20℃放置 1h 以上再次沉淀 RNA。

⑨ 在微量离心机中于 4℃以 12000×g 离心 10min，收集沉淀。仔细倒出上清液，丢弃。

⑩ 沉淀用 500μl 70%乙醇洗 3～4 次。如果洗涤过程中 RNA 沉淀没有移动，就没必要离心。在空气中干燥微量离心管去除残余的乙醇。

注意　如果需要，最后一步用 95%的乙醇洗涤能够加速样品的干燥。

⑪ 将 RNA 溶于最小体积的 TE 缓冲液或者二乙基焦碳酸酯（DEPC）处理的水中。在 65℃保温 10min 有利于 RNA 溶解，但是如果乙醇沉淀后的 RNA 样品干燥彻底，就不需要在 65℃保温 10min。如果不急用，可以直接储存在乙醇中沉淀的 RNA。确定 RNA 浓度后，将 RNA 溶液分装并储存于－80℃备用。避免反复冻融 RNA 溶液。

5.6　密度梯度离心

原始方案和几个目前使用的方法是用胍盐裂解细胞，能够从富含核酸酶的细胞或组织中分离 RNA。所形成的亚细胞组分混合物需要进行生物大分子的相互分离，尤其需要除去 RNA 制备物中的 DNA。尽管 RNA、DNA 和蛋白质密度之间只有微小的差别（表 5.3），但是用密度梯度法能够将这些组分分离。

表 5.3　等密度离心时，生物大分子的密度范围

分　子	密　度	分　子	密　度
蛋白质	1.2～1.5g/ml	RNA	1.7～2.0g/ml
DNA	1.5～1.7g/ml		

密度梯度离心，更确切地说是等密度离心，是生物大分子在密度梯度介质中运动到介质密度与这种生物大分子密度相等的离心技术。这类分离的经典密度介质是 CsCl、CsTFA 和 Cs_2SO_4[1]。这些分子将在介质密度与其密度相等的位置积累，悬浮在那里直到离心结束。有些情况下，RNA 比任何位置的介质密度大，因此离心后 RNA 沉淀在管子底部。如果介质的密度增加，RNA 就如同质粒 DNA 一样，密度梯度离心后形成 RNA 条带。

5.6.1　氯化铯

CsCl 是一种高密度盐，超离心能使 CsCl 溶液形成线性梯度。将均相溶液（如细胞裂解液）置于 CsCl 溶液上，超离心分离生物大分子。用 CsCl 进行等密度离心不需要制备梯度溶液。通常 CsCl 梯度变化大，其最大密度超过了最大密度的生物大分子，离心的结果是较高密度的分子，如 RNA，将沉淀在离心管底部。离心力、所有生物大分子运动到它们的平衡位置所需要的时间决定了密度梯度离心的效果。而实际的离心时间又取决于转头的大小。落地式超离心进行 RNA 制备通常离心过夜，而台式超离心或“微量超离心”（如 Sorvall Discovery M150 SE，图 5.5）完成相同的分离只需要 3h。

5.6.1.1　实验方案：CsCl 梯度离心方法

此处介绍的 RNA 分离方法对 Glisin 等（1974）、Ullrich 等（1977）、Chirgwin 等

[1] 也曾使用其他材料如甘油、ficoll、metrizamide 和蔗糖。主要由于这些材料价格便宜，纯度高。根据密度差异，最好用一种铯盐进行核酸分离。

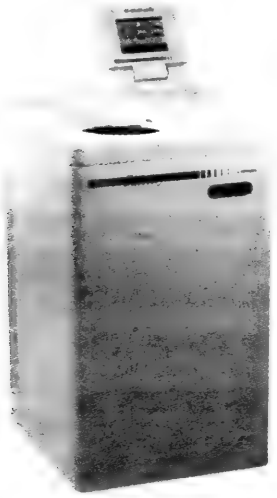


图 5.5 Sorvall Discovery M150 SE 微量超离心。较小半径的转头产生的离心力（g）较高，使等密度 RNA 制备能够在 3h 或更短的时间内完成。Kendro Laboratory Products 惠赠

(1979) 分离 RNA 方法进行了修改。

① **戴手套！**

②a 针对组织培养物：500×g 离心 5min 收集细胞。尽量倒去上清液。用磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）（1L 溶液中含有 8.0g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.24g KH_2PO_4）洗涤细胞沉淀一次。尽量除去 PBS。如果 RNase 是主要的问题，在 4℃离心，并用冰冷的 PBS 洗涤细胞。

②b 针对组织：快速收集组织并在冰冻的盐溶液中切碎。将组织迅速转移到适当的已经盛有裂解缓冲液的匀浆器皿中（步骤③）。如果组织在液氮中快速冷冻，在实验室桌面上快速击打（通常组织块用铝膜包裹）使之粉碎可能有益。以这种方式将粉碎后的组织迅速转移到裂解缓冲液中，使之融化。

注意 参阅第 6 章从组织中提取 RNA 的详细知识。

③ 加入 5 倍体积（沉淀体积）的溶液：

6mol/L 盐酸胍（或 4mol/L 异硫氰酸胍）

5mmol/L 柠檬酸钠（pH 7.0）

0.5% sarcosyl

10mmol/L β-ME（用前加入）

温和涡旋，可能有助于沉淀分离。

注意 1 在裂解缓冲液中，盐酸胍和异硫氰酸胍可以互换使用。

注意 2 在加入 β-ME 之前，异硫氰酸胍溶液可以在 4℃储存几天。在使用前，将异硫氰酸胍溶液加热到 37℃，冷却到室温后加入 β-ME 至终浓度为 200mmol/L，立即使用。如有必要，可以用 0.2μm 的滤膜过滤溶液。

注意 3 超离心管必须与胍盐缓冲液和 β-ME 兼容。

④ 组织悬浮液来回通过 19 号针头；或者用杜恩斯匀浆器来回拉几次，手工匀浆组织；或者用机械办法（如 Polytron 匀浆器）在室温下破碎细胞或组织。无论哪种情况，产生的剪切力能够物理断裂基因组 DNA，阻止高分子基因组 DNA 产生一种不可透过的网状物，后者会阻止 RNA 沉淀。

注意 为了获得高质量 RNA 的最大回收，该步要避免溶液过热或形成气泡。

⑤ 如果需要，每 2.5ml 裂解液加入 1g 固体 CsCl。如果其他分子在相同的密度与 RNA 共纯化，就需要照这种方法加入 CsCl。

⑥ 将 5.7mol/L CsCl（溶于 100mmol/L EDTA，pH 7.5）转移到超离心管中作为垫底溶液。垫底溶液占整个离心管体积的 25%左右。离心管是纤维素硝酸酯或聚异质同晶体（polyallomer），与所用的离心管套、转头必须兼容。

⑦ 在氯化铯垫底溶液顶部，仔细铺上组织或细胞裂解液，直到充满离心管。每个离心管与其离心管套子和盖子一起称重。各个盛入样品的离心管（包括离心管、离心管套子和盖子）之间的重量差异不超过 0.05g。照厂家说明封闭离心管。在放入转头前，还要花点时间再次称量每个离心样品的重量。如果不按照厂家的规定精确平衡，离心时会产生灾难性的后果。

⑧ 用水平式转头离心。落地式离心机要离心过夜，台式微量超离心需要 3～4h。每个转头的指南说明了纯化 RNA 所需要的离心力。

注意　离心过程中冷却离心腔将导致 CsCl 沉淀，密度梯度遭到破坏。这类离心要在室温下进行。

⑨ 离心后，用无菌的巴斯德移液管或无菌的 5ml 枪头仔细吸取除去上清液。操作时要特别仔细，不要破坏离心管底部的沉淀。许多研究人员宁肯吸去 80%的上清液，剩余的溶液倾泻倒去。除去上清液后，在 RNA 沉淀位置上面，切掉离心管上面部分。可以用止血铗夹住刀片，在 Bunsen 灯上加热，然后在离心管上切割。切割之后，可见 RNA 沉淀（图 5.6）。

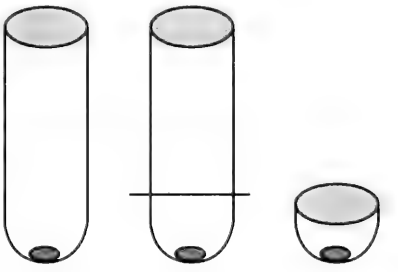


图 5.6　等密度梯度离心后回收 RNA 的方法。(a) 除去梯度溶液后 RNA 沉淀出现；(b) 刚好在 RNA 上方切割离心管；(c) RNA 留在晶状体形的摇篮中。这种方法回收 RNA 能够避免离心管壁上残留的 DNA、蛋白质污染 RNA 样品

注意　超离心后蛋白质和/或 DNA 可能黏附于离心管壁。如果不将离心管壁切除，溶解回收的 RNA 将被蛋白质和/或 DNA 污染。因此，将离心管底部半透明的 RNA 沉淀与离心管其他部分切开，有助于消除蛋白质和/或 DNA 对 RNA 的污染。

⑩ 将 RNA 沉淀彻底溶于最小量体积的下列缓冲液中：

10mmol/L Tris，pH 7.4

5mmol/L EDTA

0.1% SDS（最好加入该组分）

然后将 RNA 溶液转入一个无菌的微量离心管中。如果制备的 RNA 样品量大，就将 RNA 溶液转移到锥形的 15ml 聚丙烯离心管中。

注意　这类纯化所获得的 RNA 沉淀常常很难在含水的缓冲溶液中溶解。RNA 沉淀量越大，沉淀溶解的难度就越大。将沉淀在－20℃冷冻，然后融化则有助于 RNA 沉淀的溶解。少许涡旋对沉淀溶解也有一些帮助。

⑪ 用 2 倍体积的氯仿∶异戊醇（4∶1，体积比）或 2 倍体积的氯仿∶丁醇（4∶1，体积比）抽提一次。离心分相，将水相转移到灭菌后的微量离心管中。

⑫ 有机相再用等体积的下列缓冲液抽提：

10mmol/L Tris，pH 7.4

5mmol/L EDTA

0.1% SDS（最好加入该组分）

合并水相。

注意　氯仿抽提能够去除 RNA 制品中残留的污染。

⑬ 加入 0.1 倍体积 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）和 2.5 倍体积冰冷的 95%乙醇，混合后在－20℃沉淀 RNA 几小时。如果 RNA 溶液体积大，有可能要分装到两个或更多离心管中进行沉淀，或者在一个 15ml 的 Corex 玻璃管中进行沉淀。

⑭ 在微量离心管中沉淀时，用 12000×g 离心 10min（如有可能在 4℃离心）。如果在 Corex 玻璃管中沉淀，管子套上套子后，在 9000×g 离心 20min 以上。

当心　进行 RNA 沉淀时，离心力绝对不能超过转头和离心管所能耐受的离心力。

⑮ 仔细倒去上清液，沉淀至少用 70%乙醇洗涤一次。倒去 70%乙醇洗液。如果需要，再用 95%乙醇洗涤一次，能够加速样品干燥。不彻底干燥 RNA 样品是明智的。

⑯ 最好以乙醇沉淀的方式将 RNA 储存于－80℃，或者将 RNA 定量后分装储存于－80℃（避免重复冻融 RNA 样品）。每 10^6 个细胞可以产生 50～75μg 质量非常高的 RNA，具体的产量取决于细胞种类。

5.6.2 三氟乙酸铯[1]

CsTFA（Amersham Biosciences，Piscatway，NJ）是等密度分离 RNA 和 DNA 的优秀介质。使用的方法与 CsCl 和 Cs_2SO_4 类似，在超离心时能够自动形成密度梯度。三氟乙酸阴离子使 CsTFA 具有产生特别高质量核酸制备物的特性。

① 高密度溶液。CsTFA 溶解度很大，能够形成密度达到 2.6g/ml 的溶液。等密度分离核酸时，该密度比 CsCl 所能够达到的最大密度 1.7g/ml 高很多。三氟乙酸阴离子的存在促进了核酸和蛋白质的水化和溶解。结果，三氟乙酸铯溶液中的核酸密度比 CsCl 溶液中的核酸密度低，蛋白质更容易与核酸解离。

② 等密度 RNA 条带。由于 RNA 的密度降低，介质的密度又大，使 RNA 在等密度时形成条带。用 CsCl 或 Cs_2SO_4 溶液进行等密度离心，RNA 不容易形成条带。如果需要，蛋白质、DNA 和 RNA 都能够在同一 CsTFA 梯度中产生条带（Zarlenga 和 Gamble，1987）。另外也可以制备出使 RNA 沉淀的梯度（图 5.7），采用 CsCl 梯度的方式回收 RNA。

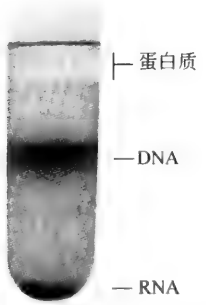


图 5.7 三氟乙酸铯梯度离心，用异硫氰酸胍抽提牛肝生物大分子，等密度梯度离心分离。牛肝的异硫氰酸胍抽提物（18ml）铺盖在 19ml CsTFA（ρ=1.51g/ml）上面，125000×g 离心 16h。约 3.5mg 总 RNA 沉淀于管子底部（ρ=1.62～1.9g/ml）。该 RNA 品种 DNA 含量低于 0.4%（用 DNA 探针检测的结果）。在原来的异硫氰酸胍抽提液和三氟乙酸铯梯度溶液界面附近所形成的条带是 DNA，密度 ρ=1.6g/ml。顶部是蛋白质，密度 ρ=1.2～1.5g/ml。Amersham Bioscience 惠赠

③ 蛋白质变性不需要变性剂，CsTFA 能溶解蛋白质并使之与核酸发生解离。因此，用 CsTFA 超离心可以不用有害而又费时的有机溶剂进行抽提操作或者不用蛋白酶 K 处理。不用苯酚抽提，核酸尤其是分离 hnRNA 和基因组时，这些核酸分子发生剪切或降解的机会就降低了。而且，由于 CsTFA 本身是优秀的核酸酶抑制剂，CsTFA 有利于完整核酸分子的分离。

④ 提高纯化 RNA 的产率。CsTFA 能够高水平回收核酸。CsTFA 的阴离子有盐进（salting-in）效应，而氯离子和硫酸根阴离子是盐出（salting-out）效应，盐进效应减少了超离心过程中蛋白质沉淀的机会，减少了分离过程中核酸的损失。

⑤ 极性溶剂中的溶解性。在极性溶剂中 CsTFA 的溶解性有利于核酸从 CsTFA 溶液中回收。经过梯度分离后，无需透析或抽提除去盐就可以直接进行乙醇沉淀。

⑥ 较低的熔解温度。核酸双链在 CsTFA 中的熔点比在 CsCl 中的熔点低，熔点低有助于单链核酸与双链核酸的分离，该法有助于从 DNA：RNA 杂合子回收完整的单链 DNA 和 RNA。

[1] Amersham Bioscience 惠赠的数据和实验方案。

密度梯度离心法的缺点是密度梯度材料（如 CsCl、CsTFA）价格昂贵，超离心的价格也昂贵，离心时间长，去除梯度纯化 RNA 的杂质工作量大，同时只能做几个样品。由于这些及其他的几个原因，新近发展的 RNA 纯化试剂和试剂盒完全不需要超离心。但是有些应用还需要用密度梯度离心分离 RNA。由于这个原因，在此讨论 CsCl 方案（前面介绍的）和 CsTFA 方案。

5.6.2.1　*实验方案：CsTFA 梯度方法*

该方法对 Okayama 等（1987）的原始方案进行了修改。如同前面所介绍的，RNA 将在等密度梯度离心管底部形成沉淀，而不是产生离心条带。建议用这种方法制备不同组织来源的总 RNA，还可以对这个方法加以修改使之适宜于起始材料只有 25mg 的小规模或者 6g 的大规模。CsTFA 梯度离心时不可以使用纤维素硝酸酯离心管。

（1）CsTFA 的预先制备

通常 CsTFA（Amersham Biosciences No. 17-0847-02）的密度是（2.0±0.05）g/ml。在 100mmol/L EDTA(pH 7.0）中制备成（1.51±0.01）g/ml 的工作溶液。100ml 溶液制备：取$\left(\frac{51}{\rho-1}\right)$ml 的 CsTFA（$\rho$ 是产品的密度），与 40ml 溶液［100mmol/L Tris（pH 8.0），100mmol/L KCl，1mmol/L EDTA］和$\left(60-\frac{51}{\rho-1}\right)$ml 无菌的双蒸水混合。CsTFA 工作溶液的密度可以更改，以适应特殊的实验方案。随产品送来的还有厂家提供的特定密度的 CsTFA 溶液制备的准确方案。

① **戴手套！**

②a 组织培养物：在 500×g 离心 5min 收集细胞。尽量除去上清液。细胞用 PBS（1L 溶液含有 8.0g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.24g KH_2PO_4）洗一次。尽量去除 PBS 溶液。如果 RNase 是主要问题，在 4℃离心并用冰冷的 PBS 洗涤细胞。

②b 组织：快速收集组织，在冰冷的盐溶液中切碎。迅速转移到适当的已经盛有裂解缓冲液的匀浆器中（步骤③）。如果组织在液氮中快速冷却，在实验室台面敲打用铝膜包裹的样品进行粉碎可能有好处。用这种方式能够将样品迅速转移并在裂解缓冲液中融化。

注意　第 6 章详细介绍了从组织中提取 RNA 的方法。

③ 每克组织或细胞沉淀，加入 18ml 5.5mol/L 异硫氰酸胍溶液（5.5mol/L 异硫氰酸胍，25mmol/L 柠檬酸钠，0.5% sarcosyl，用 NaOH 调 pH 至 7.0，使用前加入 200mmol/L β-ME）。

注意 1　异硫氰酸胍和盐酸胍在该缓冲液中可以替换使用。

注意 2　在加入 β-ME 之前，异硫氰酸胍溶液在 4℃能够储存几天。在使用前，将适当体积的异硫氰酸胍溶液加热到 37℃，冷却到室温后，加入 β-ME 至 200mmol/L 的终浓度。如果需要，经过 0.2μm 的滤膜过滤让溶液变清。

注意 3　保证胍盐缓冲液、CsTFA 和 β-ME 与超速离心管兼容。

④ 用手工匀浆（重复通过 19 号针头，或用 Dounce 匀浆器倒腾几下）或机械匀浆的方法（如 Polytron 匀浆器）破碎细胞或组织。这两种情况下，剪切力是断裂基因组 DNA 所需要的。基因组 DNA 断裂能够阻止缺乏通透性的高分子 DNA 网状物的生成，否则将阻止 RNA 沉淀。

注意　为了回收最高质量的 RNA，操作这一步时要避免溶液过热或形成气泡。

⑤ 仔细地将裂解液转移到锥形离心管（例如 50ml）中。1500×g 离心 5min 沉淀不溶性物质。

⑥ 避免干扰沉淀，将透明的裂解液转移到新的离心管中。

⑦ 如果裂解液仍然很黏稠，重复经过 19 号针头进一步剪切 DNA 直到黏度降低。通常重复经过针头 10～12 次就足够了。

⑧ 在 15℃以 5000×g 离心 20min 除去细胞残渣。回收离心后的上清液（特别小心别把沉淀残渣混入）。

当心 本法所使用的离心力不得超过离心管所推荐的最大离心力。

⑨ 如果必要，用 5.5mol/L 异硫氰酸胍溶液（见③）将上清液体积调至所期待的上样体积（表 5.4）。

表 5.4 用 CsTFA 进行 RNA 纯化时体积、管子、转头和速度的选择

项　目	Beckman 转头		
	SW 50.1	SW 28.1	SW 28
每管的组织量			
最少/mg	25	100	400
最多/mg	140	450	1000
每管 CsTFA/ml	2.7	8.5	19.0
每管样品量/ml	2.5	8.0	18.0
125000×g 所需要的 RPM	31000	25000	25000

注：Amersham Biosciences 惠赠的数据。附录 9 的附表 9-1 和附表 9-2 提供了其他转头的物理性质。

⑩ 根据样品的数量和体积，选择合适的转头。附录 9 的附表 9-1 和附表 9-2 对这些选择可能有用。使用 CsTFA 时不要使用纤维素硝酸酯管。首先将 CsTFA 溶液灌入各个离心管中，然后将样品加至 CsTFA 溶液上面直至离心管顶部。

⑪ 用天平称量平衡。各个样品（包括套子、螺丝盖和离心管）要称量，样品间的误差要低于 0.05g。然后将样品放入转头。在放入转头之前再花点时间再次称量一次离心管是值得的。没有精确平衡就离心将造成灾难性的后果。

⑫ 在水平离心转头上 15℃以 125000×g 离心 16～20h。此时，RNA 将沉淀到离心管底部，DNA 则在离心管 2/3 处形成条带。

⑬ 离心之后，仔细吸去管子中的大多数溶液直至 DNA 条带刚被除去。如果 DNA 条带不可见，则在离管子底部 1cm 处不连续吸去溶液。倾倒出管中剩余的溶液，最后将离心管倒置于 3～4 张 Kimwipes 滤纸上 5min 吸干残余的溶液。

⑭ 用无菌的刀片将离心管底部切下（见图 5.6），每边留下足够的边壁使管底成为一个小杯。

⑮ 用两份适当体积的缓冲液［DEPC 处理的水或 pH 7.4 的 TE（10mmol/L Tris-Cl，pH 7.4；1mmol/L EDTA）］直接在管底溶解 RNA 沉淀。

注意 建议至少用两份小体积（100～200μl）的缓冲液来回收管底的 RNA 沉淀。来回吸取/排出可能有利于 RNA 的彻底溶解。记住，将 RNA 尽可能保持在高浓度，使所有操作，包括重复沉淀都能够在微量离心管中完成。

⑯ 将两份 RNA 溶液混合，涡旋。在 65℃加热 10min 后再次涡旋。

⑰ 简单离心或者低速离心除去不溶性物质。

⑱ 测定 RNA 浓度（第 8 章）。如果需要，用沉淀 RNA 的方法浓缩 RNA 或更换缓冲液。

⑲ 分装后，保存于－80℃备用。

5.7　同时分离 RNA 和 DNA

还有一些值得注意的方案用来从细胞或组织中分离 RNA。这些方案的操作复杂度有所不同。很多公司现在提供能够从各种生物样品分离 RNA 的装置、试剂、溶液或树脂。使用这些产品分离 RNA 的操作简便性、速度、费用和有效性方面是有差别的。还介绍了几个方案，能够从同一生物样品中同时回收 RNA、DNA 和蛋白质（如 Majumdar 等，1991；Chomczynski，1993），其中有些方法能够从厂家购买相应的产品。

这里所介绍的方法不需要特殊的设备，都是分子生物学实验室使用的设备。本技术的核心是已介绍过的酚相裂解液中 DNA 和 RNA 的溶解度受 pH 调节（Chomcznski 和 Sacchi，1987）。在酸性酚中抽提时，水相回收 RNA，DNA 处于酚相和水相的界面。当含有 RNA 的相转移到一个新离心管后，将剩余溶液 pH 调至碱性，DNA 就从酚相和有机相-水相界面抽提出来，进入水相，这就是所谓的反相抽提。在这个方案中，研究人员先用乙酸钠（pH4.9）将抽提混合物变成酸性，或者等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提 SDS/EDTA 裂解液（pH8.7），抽提液的总 pH 接近 7.6。

可以直接裂解组织培养瓶中的细胞，或者首先离心收集细胞后再进行裂解。在加入裂解缓冲液之前，必须温和地分散沉淀细胞，因为操作剧烈将剪切基因组 DNA。因此如果要纯化基因组 DNA，研究人员不可以涡旋这种悬浮液或裂解液，DNA 断裂片段是不可接受的。

5.7.1　实验方案：同时分离 RNA 和 DNA

① **戴手套！**

② 预先要按照图 5.2 制备酚：氯仿：异戊醇抽提缓冲液，但是在加入其他试剂前酚必须用水饱和 2～3 次。

③a 组织培养物：用吸取的方法去除生长的培养基。用冰冷的 PBS（1L 溶液中含有 8.0g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.24g KH_2PO_4）洗涤单层细胞 2 次，每次 5ml。将细胞培养物在冰上冷冻 15min 后再进行裂解可能会有所帮助。用吸取的方法尽可能去除 PBS。每 100mm 组织培养皿（即 $4\times10^6\sim5\times10^6$ 个细胞）加入 2ml 冰冷的裂解缓冲液（10mmol/L EDTA，pH 8.0；0.5% SDS）。将培养皿倾斜，保障所有细胞都能接触到裂解缓冲液。在冰上保温 3min。温和而又彻底地振荡可能有利。从培养液中收集的细胞，每 10^6 个细胞使用 200μl 裂解缓冲液。

注意　在冰上冷却试剂和细胞是控制 RNase 活性的好方法。但是研究人员要根据经验确定裂解前在冰上放置 15min 是否影响细胞生化从而影响实验的结果。

③b 组织：分离的新鲜组织（至 100mg）在冰上切碎。每毫克组织用 250ml 裂解缓冲液（10mmol/L EDTA，pH 8.0；0.5% SDS）。在室温下用 Dounce 匀浆器温和匀浆。不要使用 Polytron 匀浆器匀浆，否则基因组 DNA 将发生剪切。第 6 章讨论了从组织中抽提的一些细节问题。

④ 将裂解液转移到冰上已经预冷却的 15ml 的锥形离心管中。若缩小规模，锥形微量离心管也适合。由于染色质的释放使溶液黏度增加。使用无菌刮刀有助于裂解液定量回收。此外，也可以用 1～2ml 溶液（10mmol/L EDTA；100mmol/L 乙酸钠，pH 4.9）冲淋平板来定量回收裂解液。

⑤ 加入等体积冰冷的有机抽提缓冲液（制备方法见②）。要保证离心管和酚、氯仿兼容。

⑥ 温和倒置几次，将管中的溶液混合。不要涡旋。在没有混合时，在冰上放置能够显著提高产量。

⑦ 在适当的转头中离心将水相和有机相分开。

当心 离心速度不得超出转头所规定的速度限制，或离心管所能耐受的最大离心力（g）。

（1）RNA 的回收

⑧ 收集水相，并转移到一个新的预冷后在冰上放置的离心管中。转移时不要干扰了蛋白质界面层。从界面和有机相中回收 DNA 要等到 RNA 回收结束后。水相转移后，剩余溶液放置在冰上，直到进行 DNA 抽提操作。

⑨ 水相用等体积的、新鲜的、冷却的有机抽提缓冲液抽提（制备见②）。

⑩ 同以前的方法一样离心。仔细地将水相转移到一个新的离心管中（注意，不可扰动水相和有机相之间的界面层）。

⑪ 每 4ml RNA 溶液，加入 500μl 冰冷的 1mol/L Tris-Cl（pH8.0）和 200μl 5mol/L NaCl。仔细彻底地混合。加入 12ml（2.5 倍体积）冰冷的 95%乙醇，彻底混合。在－20℃放置 1h 以上。

⑫ 在适当的离心管中，9000×g 离心 10min 收集 RNA 沉淀。最好在 4℃离心。小心地倒去上清液。

⑬ 用 70%的乙醇洗沉淀 2～3 次。离心回收沉淀。仔细地倒出上清液。

⑭ 样品在空气中干燥。最后用 95%乙醇洗涤沉淀可能加速空气干燥。

⑮ 将 RNA 沉淀溶于 200μl 冰冷的 TE 缓冲液（10mmol/L Tris-Cl，pH 8.0；1mmol/L EDTA）中。将溶液在冰上放置 1h 后，转移到一个新的离心管中。可以再加一份冰冷的 TE 缓冲液冲淋原来的离心管。冲淋液与第一份溶液合并。

⑯ 每 300μl RNA 溶液，加入 6μl 5mol/L NaCl 和 0.8ml 冰冷的乙醇。混合后在冰上放置 5～10min。随后溶液变成乳白色，即 RNA 沉淀。这种沉淀可以直接进行下一步操作，也可以在－80℃放置。

⑰ 在微量离心机中离心 10min，最好在 4℃离心。仔细地除去上清液，像第⑬步和第⑭步那样，仔细地除去多余的乙醇并干燥 RNA。

⑱ 将 RNA 溶液悬浮在最小体积的缓冲液（例如 DEPC 处理的水）中，在冰上放置 15min 使样品溶解。样品溶解所需要的时间取决于样品干燥的程度，越干燥，RNA 样品溶解所需要的时间越长，就要在冰上放置更长的时间。

⑲ 测定 RNA 的浓度。将水溶液分装后置于－80℃保存。

（2）DNA 的回收

⑳ 回到第⑧步保存的有机相。尽量除去水相。如果需要，还要除去少量的界面物质，从而消除 RNA 的污染。但是这种操作通常并不是必需的，因为后续的操作能水解残余的

RNA。另外，纯化的 DNA 也可以在最后一步与 RNase 保温，消除所有污染的 RNA。

㉑ 加入等体积 1mol/L Tris 碱溶液到剩余的有机相/界面中。1mol/L Tris 溶液的 pH 没有调，大约 10.5。温和振荡，彻底混合。不要涡旋。

注意　该部分操作叫反相抽提；制造强的碱性环境有助于 DNA 反抽提到水相中。

㉒ 在 2000×g 离心 15min，如果可能在 4℃离心。水相与有机相分离。将上层的水相转移到一个新的离心管中。

㉓ 重复㉑和㉒步的操作，但不要将水相混合，让它们分别置于不同的离心管中。

㉔ 在每份 Tris：DNA 水相溶液中加入等体积的氯仿：异戊醇（24：1），仔细而又彻底地混合。短暂离心，分相。记住没有苯酚时，氯仿与水能够很快分离。仔细地将上层水相转移到一个新的离心管中。

㉕ 加入 0.1 倍体积的 3mol/L NaAc(pH 7.0) 和 2.5 倍体积的 95%乙醇，沉淀 DNA。先温和旋转，然后倒置将溶液混合彻底。不要涡旋。

注意　乙醇的加入能够引起遗传材料的快速沉淀，这些遗传材料呈纤维状。低速（500×g）离心 2～3min 能够回收 DNA。另外可以用硅烷化的 Pasteur 移液管从乙醇溶液中取出基因组 DNA。硅烷化的管子能够最大限度减少 DNA 对玻璃的黏附。

㉖ 用 70%乙醇洗涤沉淀的 DNA 3 次，每次 500μl。将沉淀的 DNA 转移到一个新的离心管中。在适当体积的 TE 缓冲液（pH 8.0）中溶解，确定 DNA 浓度。

5.8　试　剂　盒

现在有很多厂商提供试剂盒用于核酸分离，很少有研究人员自制试剂分离核酸了。用试剂盒能够节约时间，从长远看能够节约成本。当然试剂盒能够增加产量，但是要肯定这个试剂盒不仅能够增加所需要的 RNA 产量［例如细胞总 RNA、poly(A)$^+$RNA］，同时要保障所获得的 RNA 能够用于后续的应用。更重要的是，要拿起电话询问厂家的地区代表，甚至向国际销售部索取试用试剂盒（即免费使用的试剂盒）。若对于某个特定的产品感兴趣，多数厂家将乐于提供一次免费使用品，或者至少提供一次打折产品使用。

更合乎要求的试剂盒是最小甚至不使用有机溶剂苯酚和氯仿的传统使用剂量。如果试剂盒还要使用其他有毒的有机溶剂或者两种有毒的有机试剂，试剂盒已经将实验方案进行了优化使有机溶剂的使用剂量最小化。但是使用过的有机溶剂必须照实验室有关规定处理。

图 5.8　核酸分离的硅胶滤器。离液、高盐条件下，核酸与管内的硅胶结合，裂解缓冲液组分和其他细胞大分子被洗涤除去。最后用低盐条件将纯化的核酸样品洗脱出来。实验室内最常用的滤器类型是足够小的、适宜于标准的 1.7ml 微量离心管的（图中显示的是 2.2ml 微量离心管）。GenElute 系统：Sigma-Aldrich 惠赠

5.8.1　硅胶技术

在核酸分离领域的重要创新之一是硅胶滤器的建立。硅胶滤器足够小，适宜于标准的微量离心机。这些滤器是玻璃纤维构成的，位于塑料管底部。能够将滤器插入标准的 1.5ml 离心管中（图 5.8）。这些产物不仅能够用来从生物样品中纯化 RNA，而且也能

够用来精制不同操作所获得的 RNA 或 DNA，例如限制性酶切、连接、cDNA 合成和 PCR 扩增的核酸产物。有很多厂家能够提供这些基于硅胶滤器的产品。硫氰酸胍盐溶液提供了一种高盐浓度、高离液的环境。此时，RNA 或 DNA 与硅胶结合。经过一系列的清洗，在非常低的盐浓度下，纯化的核酸从柱子中洗出。除了微量离心机和微量移液器外，这些操作不需要特别的设备。核酸的纯化和精制最好能够在很短的时间内完成。

5.9 其他方法

该法（Peppel 和 Baglioni，1990；Salvatori 等，1992；Zolfaghari 等，1993）用离子型去污剂 SDS 抑制核糖核酸酶活性。不用胍盐缓冲液、苯酚或等密度梯度离心，就能够快速地分离出细胞总 RNA。该法适宜于原核细胞和真核细胞。如果从组织中分离 RNA，最好与某种形式的机械破碎联合使用。所用的试剂多数是分子生物学方法所使用的试剂。抽提量大时，直接将使用体积放大就可以了。从 10^6 个细胞中能够分离出 100μg RNA。原始的方法（Peppel 和 Baglioni，1990），以及此处介绍的修改方法，成为进一步发展一些普遍使用的非苯酚抽提分离 RNA 的试剂盒的基础。

5.9.1 实验方案：用十二烷基硫酸钠和乙酸钾试剂快速分离 RNA

① **戴手套！**

②a 组织培养物：从含有所需细胞的组织培养皿中除去生长介质，用 PBS（1L 溶液含有 8.0g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.24g KH_2PO_4）冲淋细胞，吸出 PBS 并除去。用裂解缓冲液（2% SDS；200mmol/L Tris-Cl，pH 7.5；0.5mmol/L EDTA）直接裂解细胞，每平方厘米用 50μl 裂解缓冲液。温和振荡培养皿直到细胞彻底裂解。在使用前制备裂解缓冲液，在室温下储存。

②b 组织：快速收集组织，并在冰冷的盐溶液中迅速切碎。快速转移到含有裂解缓冲液（同②a）的匀浆器中。如果组织在液氮中快速冷冻，用铝膜包裹在实验室台面敲打击碎则更好。然后迅速转移到裂解缓冲液中融化。每毫克样品用 1ml 的裂解缓冲液。用手工匀浆（经过 19 号针头反复剪切，或用 Dounce 匀浆器）或者机械匀浆（如 Polytron 匀浆器）。在这步操作时要避免溶液过热或起泡。

③ 将裂解液转移到一个无菌的微量离心管（1.7ml 或 2.2ml）中。盖住盖子后倒置 15～20 次。

④ 在步骤②中使用的每 500μl 裂解缓冲液中，加入 150μl 乙酸钾溶液（50g 乙酸钾，11ml 乙酸，加水至 100ml）。在使用前制备该溶液，并储存于－20℃。

⑤ 小心垂直倒置离心管 15～20 次保证溶液彻底混合。

⑥ 在冰上放置至少 3min 以上，但是不要超过 5min。

⑦ 在微量离心机上以最大速度在室温下离心 5min。

⑧ 小心地回收上清液并将上清液转移到一个新的离心管中。

⑨ 上清液用 300μl 氯仿：异戊醇（24∶1，体积比）混合物抽提。离心 30s 分相。在不干扰蛋白质界面的情况下将上层水相转移到新离心管中，重复抽提。

⑩ 将上层水相转移到已经在冰上冷却的新离心管中。

⑪ 加入等体积（约 650μl）冰冷的异丙醇沉淀 RNA。溶液在－20℃保温 30min。

⑫ 室温离心 5min 收集 RNA 沉淀。

⑬ 小心地除去上清液。用 70%乙醇洗沉淀 2～3 次。如果沉淀浮出，则要离心让 RNA 沉淀后倒去乙醇。RNA 沉淀在空气中干燥。最后一步用 95%乙醇洗涤有利于 RNA 样品干燥。

⑭ 将 RNA 尽量溶于最小体积 TE 缓冲液或 DEPC 处理的水中。测定 RNA 浓度，然后分装并储存于－80℃备用。

5.9.2　实验方案：原核 RNA 的分离

这种快速有效分离细菌 RNA 的方法是 Peppel 和 Baglioni（1990）、Salvvatori 等(1992)、Zolfaghari 等（1993）方法的修改版。必须使用后面介绍的裂解缓冲液，不要使用标准的 NaOH/SDS 裂解缓冲液。标准的 NaOH/SDS 裂解缓冲液是用来破碎细菌细胞并从中抽提质粒的，能够使 RNA 发生快速而又严重的水解。

① **戴手套！**

② 预先：制备 NP-40 裂解缓冲液和乙酸钾缓冲液，储存于 4℃备用。尽管这些溶液在架子上能够放置几个月，但是要在使用前检查溶液是否已经有微生物污染。

NP-40 裂解缓冲液：250mmol/L 蔗糖；20mmol/L EDTA，pH 8.0；0.75% NP-40

(注意：在其他两个组分混合并消毒后，才能加入 NP-40 去污剂)

乙酸钾缓冲液（照下列顺序制备）：

在 80%的终体积中制备 3mol/L 乙酸钾

用冰醋酸调节 pH 至 5.5

加水至终体积

每 100ml 溶液中加 100g 硫氰酸胍（GTC）。仔细而又彻底地混合。

③ 离心收集 100ml 培养液的细菌细胞。彻底除去上清液。

④ 1.5ml 冰冷的裂解缓冲液和 2ml 冰冷的乙酸钾缓冲液混合，在这种混合缓冲液中温和地悬浮细菌细胞。在冰上保温裂解液 10min。

⑤ 如果可以，在 4℃离心（10000×g）10min。要保证离心管能够耐受这样的离心力。将裂解液分装到几个微量离心管中离心，这样就可以在同一天从一个培养物中获得几份 RNA。这样操作可能是有益的。

⑥ 将上清液转移到新离心管中。注意不要将沉淀的固体转移到新离心管中。为了避免带入固体，将少量的上清液留在原来管子中是有益的。然后将上清液在冰上又放置 15min。

⑦ 于 10000×g 离心 10min。如果可能，在 4℃离心。

⑧ 将上清液转移到新的聚丙烯离心管中。用等体积的氯仿：异戊醇（24∶1）抽提。仔细而又彻底混合。离心 3min 分相。如果水相和有机相界面的带宽，重新用新鲜的氯仿：异戊醇（24∶1）抽提水相。

⑨ 将上层水相转移到新的离心管中，加入 0.6 倍体积冰冷的异丙醇。在－20℃放置 20min 沉淀 RNA。

⑩ 于 10000×g 离心 10min 收集 RNA。如果可能，在 4℃离心。

⑪ 仔细倒出上清液。沉淀用 70%乙醇（用消毒稀释乙醇获得）洗涤几次。最后用 95%或 100%乙醇洗涤有利于样品干燥。

⑫ 样品在空气中干燥，再悬浮于 TE 缓冲液或无菌水中。确定 RNA 的浓度和纯度后，分装保存于－80℃。如果不立即使用，以乙醇沉淀的形式储存于－80℃。

5.9.3 实验方案：酵母 RNA 的分离

酵母有细胞壁，阻止了从这些真核细胞中快速回收 RNA。有很多经典方法从酵母中分离 RNA。这些方法要用玻璃珠与酵母培养液涡旋，用非酶学的方式破坏细胞的超级结构[1]。操作繁琐，在缩小规模时所获得的 RNA 很少。

此处介绍的分离 RNA 的方法是利用苯酚和 SDS 的离液性质，将样品加热、冷凝和融化促进 RNA 的分离。当样品冷凝时，苯酚晶体将插入酵母细胞，使细胞释放其内容物。在酸性条件下，苯酚抽提使 RNA 与 DNA 分离。这是离液条件下进行 RNA 纯化常用的技巧。此处所介绍的方法对 Schmitt 等（1990）方法进行了改进，能够快速分离 RNA，所需要的细胞培养物少。

① 预先：0.5ml 酵母培养物（在 YPD 培养基中培养）[2] 接种到 15ml 管子中。于 30℃温和振荡培养过夜。

注意 必须用盖子盖住管子。盖住管子能够阻止溶液的挥发，也能避免微生物的污染。

② 第二天早晨，将培养物按 1∶40 稀释于新鲜的 YPD 培养基中。继续培养 4h 或者培养至对数生长期。

③ 每 5ml 1 管，离心（500×g）5min 收集酵母细胞。除去上清液。

④ 将细胞沉淀悬浮于 400ml AE 缓冲液（50mmol/L 乙酸钠，10mmol/L EDTA，pH 5.2）中。如果细胞不能迅速彻底悬浮，加入更多的 AE 缓冲液。

注意 如果需要，在使用 AE 缓冲液前将 RNase 抑制剂加入。但是通常不需要将 RNase 抑制剂加入 AE 缓冲液中。

⑤ 将细胞悬浮液转移到一个离心管中，加入 40μl 10% SDS。来回倒置几次将内容物混合。如果第 4 步所加的 AE 缓冲液体积增大，相应地也要增加 10%SDS 的体积。

⑥ 加入等体积（约 1ml）已经用 AE 缓冲液饱和的分子生物学级苯酚。

重要提示 不要调饱和苯酚的 pH。参阅附录 3 的苯酚制备。

⑦ 将样品仔细而又彻底地混合后，在 65℃保温 4min。

⑧ 用乙醇-干冰浴或在干冰中快速冷却，直到苯酚晶体出现。如果没有乙醇-干冰浴可供使用，在－20℃放置样品 30min 也可以。

⑨ 在微量离心机中离心（12000×g，即最大速度）2min，分相。

注意 一般会出现大量的沉淀，这些沉淀含有细胞残渣，处于离心管底部。

⑩ 仔细地取出水相，不要干扰蛋白质界面层或有机相。水相转移到一个新的离心管中，加入等体积的处于室温的苯酚∶氯仿∶异戊醇（25∶24∶1）（如图 5.2）。来回倒置 2～3 次，将溶液仔细而又彻底地混合。

⑪ 以最大速度离心 2min，分相。

---

[1] 酵母基因组 DNA 的纯化常常将酵母细胞与 zymolyase 一起保温，裂解细胞壁并产生原生质体。这种处理会导致酵母细胞温和地裂解，有助于高分子量的 DNA 回收，但是分离 RNA 时不必用 zymolyase 处理酵母细胞。

[2] YPD 培养基（每升）含有 10g 酵母抽提物、20g 蛋白胨和 20g 葡萄糖，高温消毒。消毒后，YPD 培养基呈深棕色，这是由于葡萄糖在高温时发生“焦糖化”的结果。

⑫ 仔细回收上层水相并转移到一个新的离心管中。不要干扰蛋白质界面（如果有）和下层有机相。

⑬ 水相溶液用等体积的氯仿或氯仿：异戊醇（24：1）抽提一次。简单离心分相。将水相转移到一个新的离心管中。

⑭ 加入 0.1 倍体积 3mol/L NaAc（pH 5.2）和 2.5 倍体积的 95% 乙醇。将样品在－20℃放置过夜，沉淀 RNA。

⑮ 离心收集沉淀。如果可能，在 4℃离心更好。

⑯ 去除乙醇溶液。沉淀用 70%乙醇/30%DEPC 处理的水洗涤 3 次，每次 500μl。沉淀在空气中干燥，不要让沉淀彻底干燥。最后用 95%的乙醇洗涤有助于样品干燥。长期保存的话，将样品储存于－80℃。

⑰ 将沉淀悬浮于 25～50μl 无菌（无 RNase）水或 TE 缓冲液（10mmol/L Tris，1mmol/L EDTA，pH 7.5）中。

⑱ 测定 RNA 的浓度和纯度。分装后保存于－80℃。从 10ml 对数生长期的酵母菌液中可获得 150μg 左右的总 RNA。

⑲ 每次分离的 RNA，都要用凝胶电泳检测一下，保证所分离的 RNA 样品结构完整。

5.10　纯化 RNA 的短期保存和长期保存

RNA 样品正确的储存条件常常是实验室里热烈讨论的课题。储存条件不当，仅仅几个小时或几个月，就会给纯化的 RNA 样品带来深刻的负面影响。关键问题如下。

① RNA 是否已经从细胞或组织中纯化出来？

② 实验室有没有－80℃的储存条件？

③ RNA 是否在后续的 7～10 天内使用？

④ RNA 是否已经在含水的缓冲液（无菌水或 TE 缓冲液）中重新溶解？

组织和细胞收集之后，可以快速冷冻储存于－80℃或液氮中。以这种方式储存，可以在 1 年后纯化 RNA。通常，冷冻材料在裂解缓冲液中融化，并迅速机械破碎。有些研究人员在胍盐缓冲液中将新鲜组织匀浆化，然后在－80℃冷冻匀浆液，以后进行 RNA 分离。纯化的 RNA 以乙醇沉淀的方式储存于－80℃非常稳定。在这样的条件下将 RNA 储存几个月甚至更长的时间也没有问题，因为 RNA 的半衰期受生物样品来源❶的影响。如果样品在下周内就要使用，也可以将 RNA 以乙醇沉淀的方式储存于－20℃。纯化的 RNA 溶于水相溶液时（不管是无菌水还是 TE 缓冲液）就开始计算 RNA 所能够储存的时间。TE 缓冲液的优点是能够螯合很多分离方法都带有的 Mg^{2+}，而较低的 EDTA 浓度并不影响后续的 PCR 操作。镁离子和其他重金属离子是非特异性水解 RNA 所必需的，因此螯合这些离子是有益的。

除了实验方案特别标明不在冰上操作之外，必须在冰上进行操作溶于水或 TE 缓冲液的 RNA。最常用的操作是确定 RNA 浓度后，将 RNA 溶液分装并保存于－80℃。这样能够避免 RNA 溶液的反复冻融。有些研究人员将 RNA 酶抑制剂加入 RNA 样品中进行长期保存。

❶ 从一定来源（例如植物）获得的纯化 RNA 以乙醇沉淀形式在－80℃能稳定保存几年，其 RNA 水溶液在－20℃也能保存几个月。

但是加入 RNA 酶抑制剂通常是不必需的，而且可能有副作用。研究人员必须保证所加入的核酸酶抑制剂不会干扰后续的操作或与 RNA 有关的反应[1]。

一个长期储存 RNA 的方法是采用高度纯化的 100%甲酰胺（Chomczynski，1992）或厂家提供的甲酰胺稳定形式 FORMAzol（Molecular Research Center，Cincinnati，OH）。在 FORMAzol 中，RNA 能够稳定 2 年，这种试剂在实验室的使用非常成功。RNA 溶液能够直接用于变性凝胶电泳（第 10 章）。如果需要进行 cDNA 合成或反转录聚合酶链反应（RT-PCR），用 4 倍体积的 95%乙醇沉淀能除去甲酰胺。如果 RNA 浓度稀，进行乙醇沉淀时要加入 0.2mol/L NaCl 才能有效地回收 RNA。

在 RNA 储存方面有很多要考虑的事情。但是，不管采用什么形式，将纯化 RNA 储存于－80℃总是安全的。

5.11 参考文献

Carter, C., Britton, V. G., and Haff, L. (1983). CsTFA: A centrifugation medium for nucleic acid isolation. *BioTechniques* **1,** 142.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18,** 5294.

Chomczynski, P. (1992). Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res.* **20,** 3791.

Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15,** 532.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162,** 156.

Cooper, T. G. (1977). "The Tools of Biochemistry," pp. 309–354. John Wiley & Sons, New York.

Cox, R. A. (1968). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *In* "Methods in Enzymology" (L. Grossman and K. Moldave, Eds.), Vol. 12, part B, pp. 120–129. Academic Press, Orlando, FL.

Favaloro, J., Triesman, R., and Kamen, R. (1980). Transcriptional maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional S1 gel mapping. *Methods Enzymol.* **65,** 718.

Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974). Ribonucleic acid purified by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13,** 2633.

Gordon, J. A. (1972). Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry* **11,** 1862.

Majumdar, D., Avissar, Y. J., and Wyche, J. H. (1991). Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: A new approach for isolating DNA. *BioTechniques* **11,** 94.

Marzluff, W. F., and Huang, R. C. C. (1984). Transcription of RNA in isolated nuclei. *In* "Transcription and Translation: A Practical Approach" (B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds.), pp. 89–129. IRL Press, Washington, DC.

Nozaki, Y., and Tanford, C. (1970). The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidinium hydrochloride solutions. *J. Biol. Chem.* **245,** 1648.

[1] 历史上，RNA 曾经保存于不同浓度的 SDS、VDR 和超纯甲酰胺中。

Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokata, T., and Arai, K. (1987). High efficiency cloning of full length cDNA: Construction and screening of cDNA expression libraries from mammalian cells. *Methods Enzymol.* **154,** 3.

Peppel, K., Baglioni, C. (1990). A simple and fast method to extract RNA from tissue and other cells. *BioTechniques* **9,** 711.

Salvatori, R., Bockman, R. S., and Guidon, P. T., Jr. (1992). A simple modification of the Peppel/Baglioni method for RNA isolation. *BioTechniques* **13,** 510.

Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3091.

Ullrich A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tisher, E., Rutter, W. J., and Goodman, H. M. (1977). Rat insulin genes; construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196,** 1313.

Zarlenga, D. S., and Gamble, H. R. (1987). Simultaneous isolation of preparative amounts of RNA and DNA from Trichinella spiralis by cesium trifluoroacetate isopycnic centrifugation. *Analytical Biochem.* **162,** 569.

Zolfaghari, R., Chen, X., and Fisher, E. A. (1993). Simple method for extracting RNA from cultured cells and tissues with guanidine salts. *Clin. Chem.* **39,** 1408.

（刘建华译；金由辛校）

第6章　从组织中提取RNA

6.1　基本原理

用体外模型进行基础研究和应用研究的优点数不胜数。但是，仅仅用体外实验得到的结果，几乎是不可能完全而又准确地解释体内的生理现象。毫无疑问，用培养细胞进行研究，难以检测那些伴随着自然现象或实验操作所产生的许多微小和非微小的生化变化。然而，与采用组织样品甚至整个模式动物进行的研究相比，用培养细胞进行的研究就容易多了。与植物样品相反，用人类或其他模式脊椎动物的组织进行研究的难度就更大。简单地说，用培养细胞进行研究有很多优点，也有很多不足。

6.2　组织培养或组织

从培养细胞分离高质量的RNA，通常比从组织分离RNA容易得多。主要原因是从组织分离RNA必须破坏并除去组织的三维结构，而从培养细胞分离RNA只需破坏细胞单层[1]。裂解缓冲液通常含有相当苛刻的组分，这些组分是组织裂解到满意水平所必需的。先用这样的裂解缓冲液将组织匀浆化，使组织破碎到满意的水平，才能获得足量的RNA。更有甚者，有一些组织富含RNase，很难分离RNA。为了消除这个障碍，通常采用剧烈的方法分离细胞总RNA，而不是RNA亚群（如细胞质RNA、细胞核RNA，无论是否打算获得这些RNA亚群）。可喜的是，立刻快速将收集的组织冷冻并保存于－80℃，可以在更方便的时间分离RNA。

如果要研究病变组织，或者要鉴定实验操作或其他行为产生的组织特异性应答，或者要确定正常组织的分子生理学，就必须从组织分离RNA。此外，除了前面所述分离RNA的困难外，如果“病理现象”稀少，或者要征得病人同意才能采集样本，那就更难获得组织样品。从事人类样品研究的工作者也知道，收集、处理带有HIV或肝炎病毒样品是很危险的。这两类病毒流行面广、感染性强。与从培养细胞分离RNA相比，从组织样品分离RNA，不仅要修改RNA的分离策略，而且样品的储存和处理的难度大，因此要保证所有参与实验人员的安全。

---

[1] 尽管很多转化细胞株已经失去接触抑制能力，并且在体外可以形成可见的斑点。研究人员通常仅用各个斑点顶部相对少量的细胞分离RNA，而不用那些堆积在一起的大量细胞。这样能够避免内部细胞间的连接和胞外的支撑物（matrix）。

6.2.1　细胞培养的优点

① 在细胞总数相同的情况下，培养细胞暴露的总面积比组织样品暴露的总面积大得多。结果，培养细胞很容易完全裂解。相反，一些组织特别难以破碎，而另外一些组织又很难释放其 RNA。

② 很多原代细胞和永久细胞系容易培养，因此培养这些细胞所需费用低廉。

③ 可以根据需要在培养物中繁殖细胞，但很难从动物尤其是人体定期采集组织样品或进行活体检测，也几乎不可能从同一个器官中得到多种组织标本。

④ 一般来说，从培养细胞分离 RNA 比从组织分离 RNA 容易得多。

⑤ 通常破碎组织样品的方法都相当激烈，包括 Polytron 破碎和杜恩斯匀浆。如果产生过量的热，还会影响到 RNA 的稳定性。

⑥ 破碎组织样品的机械剪切力通常会破坏与膜有关的细胞器，包括细胞核。因此，组织匀浆通常会产生大量的核 RNA、基因组 DNA、线粒体和/或叶绿体 DNA。在 RNA 使用前，要除去这些成分。

⑦ 一旦从培养皿中取出，体外培养的细胞很容易彼此分离。但是组织中的细胞，通过不同类型的细胞间连接，与细胞外基质紧密地联系在一起，在组织破碎过程中，细胞外基质形成了坚硬的小碎片，需要一步或几步操作来清除这些碎片，使 RNA 达到使用所需的纯度。尽管这些额外的步骤没有技术性的难度，但这些额外操作增加了样品受损的可能性。

⑧ 培养的细胞属于同一种细胞群。与此相反，即使极小一块组织也可能包含很多类型的细胞，使之很难确定所观测到的基因表达调节来自哪一种细胞。

6.2.2　组织样品的优点

① 组织维持了其三维结构。因此可以用制冷器切片机将福尔马林固定的组织切成薄片，原位杂交检测基因表达。另一种更新的方法是用激光捕获技术（Fend 等，1999；Kuecker 等，1999；Suarez-Quian 等，1999）从组织中取出非常少量的特异性细胞，并从中分离 RNA。

② 无论是正常的组织、野生型组织还是突变型组织，未处理的组织还是处理的组织，组织的天然分子生理学没有发生改变。

③ 从相对少的组织样品（100mg 左右）可以分离出足量的 RNA，满足多种应用。

④ 从重量很大的组织样品（含有大量细胞）能够分离大量的 RNA。

⑤ 在液氮中速冻并于－80℃保存，及时延长保存时间，组织样品的 RNA 很稳定。超冷冻的组织样品，可以分成更小的小块或者研成粉末备用。当要从组织分离 RNA 时，直接将这些组织置于裂解液融化，并分离 RNA，结果会很好。

6.3　匀浆方法

研究人员初次从组织样品中分离 RNA 时，最常犯的一个错误是使用过量的组织。特别是那些有从培养细胞分离 RNA 经验的人而言，更容易犯这样的错误。如果组织样品量超过了裂解液的容量，所获得的 RNA 纯度和产量都会降低。如果增加裂解液的体积，可能要将匀浆液分装数管，增加了操作难度，减少了同时处理不同样品的数量。

此处介绍了匀浆的两种基本方法，哪种方法合适取决于组织破坏的难度。记住，因为动物细胞缺乏细胞壁，所以动物细胞一般比植物、细菌、酵母细胞更容易裂解。要遵循的一个规则就是：使用最温和且最有效的方法将组织匀浆。简而言之，匀浆的原则就是增加细胞与裂解液接触的表面积，使裂解液更充分裂解细胞。有些过度热情的研究者，采取机械力破碎每一个单个的小细胞器，这样会增加损伤 RNA 的危险性，不利于 RNA 下游分析。

6.3.1 Polytron 破碎

在大多数实验室都能够见到 Polytron 设备。Polytron 是一种驱动设备的注册商标名称（Kinematica；经 Brinkmann 公司销售），这种设备用来快速匀浆各种大小体积的所有类型的植物组织、动物组织或细菌培养液。附在发动装置上的是不锈钢探头，即“匀浆器”。匀浆器的一端是刀一样尖锐的不锈钢刀刃，能有效地切碎组织。采用不同的转速控制组织破坏的程度，最大限度减少泡沫产生量和热量。特别重要的是，操作人员必须遵照厂家推荐的所有安全方案进行操作。任何错误操作或意外，都可能导致严重的和永久的人身伤害。有其他的公司如 Omni 国际公司（Warrenton，VA）也提供驱动型匀浆装置。现在韦林搅切器大多已经被手握式或静置式匀浆器取代。

图 6.1 手握式驱动匀浆器的一次性匀浆器末端。用完后丢弃匀浆器末端，它可最低限度地减少处理不同样品时清洗匀浆器所需要的时间。而且，这些使用后的末端也可以清洗后重复使用几次。Omni 国际公司提供

尽管这种不锈钢匀浆器经久耐用，而且可以处理很难匀浆的组织，但是 20 世纪 90 年代末 Omni 国际公司（图 6.1）推出了新一代一次性匀浆器。当处理多种组织样品时，这种一次性匀浆器只需要清洁单根不锈钢探头，消除了样品交叉污染的可能性，有助于控制 RNase 活性，从而有利于 RNA 的稳定性。这类一次性匀浆器已被广泛使用，并且对于匀浆软组织很成功。针对人体组织，使用这种一次性匀浆器能降低传染媒介扩散的潜在危险。

6.3.2 杜恩斯匀浆

杜恩斯匀浆器是一种手握的玻璃器具，该器具类似于试管（图 6.2）。通常器具开口端要宽一些，这样才能使生物材料进入。伸进玻璃管的是一根特征性圆柱形玻璃研棒。这种设计使操作者能上下来回捣腾并旋转研棒，这种操作使剪切力最大化。杜恩斯匀浆实际上是一种液体匀浆，因为当样品被挤压在一个狭小的空间里，尤其是匀浆器管内壁和研棒之间时，才发生组织破碎。一些物理（机械）类型破碎细胞和/或组织常需要昂贵的设备，杜恩斯匀浆破碎组织温和、设备便宜。所以，杜恩斯匀浆器是一种分离完整细胞核和其他细胞器的理想工具，这是那些剧烈的机械破碎装置无法达到的。

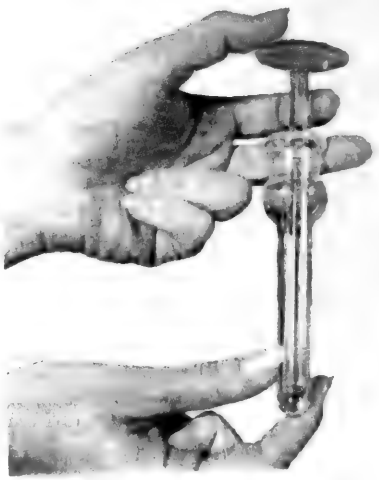


图 6.2 杜恩斯匀浆器。这种手握式工具适用于多种类型组织的匀浆。详细资料见正文。Bellco Glass 公司提供

6.4　从不同器官和组织分离 RNA 的方法

没有一种傻瓜式的方法，能够有效地从组织样品分离 RNA。每种类型的组织都有其独特的性质，从一种组织分离 RNA 的方法，只适宜于这种组织。组织的重量、所含细胞的类型、组织的年龄以及组织的状态（新鲜、快速冷冻、福尔马林固定、动物或者植物）都是要考虑的重要因素。不管组织样品从何而来，在 RNA 分离之前，组织所含 RNA 的稳定性是必须考虑的关键因素。

从组织样品分离 RNA 要遵循的一个指导原则是，获得足量有用的 RNA，不必将组织彻底破碎。有些过度热情的实验人员（例如，试图破碎每一小团组织）可能会损伤所分离的 RNA 品质和产量。如果能将组织在短期内有效地破碎，那当然好。如果不能在短期内将组织有效地破碎，温和地破碎也能增加组织接触裂解液的表面积，从而分离到足量的 RNA 用于印迹分析、RT-PCR 或其他相关应用。而且，悬浮于裂解液的匀浆液在室温下放置时间过长也会损伤待分离 RNA 的品质和产量[1]。换言之，时间就是一切。

首次进行从组织分离 RNA 的人，常犯的一个错误是与组织样品的重量有关。一般来说，文献报道或提供商业试剂的公司所介绍的方法，适于从 100～1000mg 组织分离 RNA。如果没有将相应试剂用量进行适当的放大就处理过量的组织，所获得的 RNA 产量会下降。如果研究人员增加裂解液体积，溶液体积可能大到不能在一个管子里操作，就要增加离心步骤使实验变得极其不便。同时，要将组织块切得很小，以利于组织块与裂解缓冲液和匀浆器作用。组织块过大，即使是软组织，也很难匀浆。并且组织块常常会堵塞匀浆器，尤其是使用广泛的动力驱动手握式匀浆器（如 Omni）时。

通常从组织分离 RNA 的特有性质之一，是获得了大量的 RNA(RNA 产量取决于组织重量和组织的类型)。此时可能需要 500～1000μl 无菌水溶解 RNA。有些研究人员有从培养细胞分离 RNA 的经验，用这么大体积的无菌水溶解 RNA 倒让他们不安。请记住的是，即使一小块组织都含有异乎寻常多的细胞，产生相应量的 RNA。如果 RNA 溶解不充分，电泳图谱会出现拖尾（见图 6.3），表明 RNA 需要更多的缓冲液溶解。在这种情况下进行下列操作是值得的。从原管中取少量溶液进行适量稀释，直到 28S 和 18S 核糖体 RNA（rRNA）在变性凝胶电泳时清晰可见（见第 10 章）。用分光光度法确定这种稀释溶液的浓度，然后将 RNA 母液进行适当稀释获得所需要的 RNA 浓度。分装后用乙醇沉淀的形式储存于－80℃。由于从组织分离 RNA 比从培养细胞分离 RNA 复杂，在进行这些操作过程中要采用第 8 章介绍的质量控制方法。

6.4.1　新鲜组织

必须认识到，从供体生物取出组织样品后，RNase 仍会保持降解 RNA 的活性。并且只要条件适合，这些顽固的 RNA 酶活性就会保持。即使供体生物死亡，只要环境有利于 RNase 的复活，RNase 就会恢复活性状态。因此，必须迅速破碎组织样品和失活 RNase。获得组织样品后，要马上用冰冷的磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）漂洗，称重，然后用无

[1] 有些实验室收到组织样品后，马上将其悬浮于胍盐缓冲液中匀浆，并将匀浆液储存于－80℃。尽管有些实验室曾经在后续匀浆液融化后不能有效地分离高质量的 RNA。但是用这种方法处理的多数组织，能够获得高质量的 RNA。由于该方法受到组织类型和操作人员个人等因素的影响，用这种方法是否成功没有统一的规则。

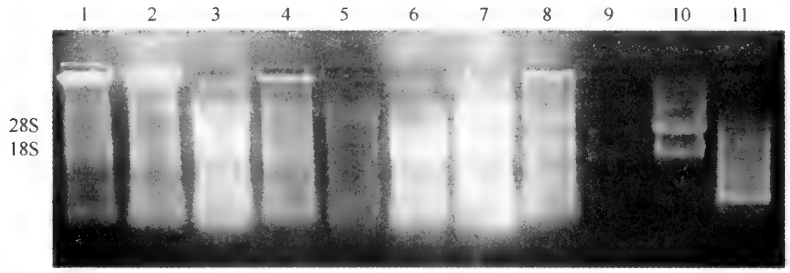


图 6.3　未充分溶解的 RNA 图谱。泳道 1～8：从人类不同组织分离的 RNA 沉淀。凝胶状沉淀溶于 500μl 溶液中，在 60℃温浴 10min，冰上放置 2h。用第 10 章介绍的方法将 RNA 溶液上样甲醛变性琼脂糖凝胶电泳。由于从组织中提取的 RNA 产量过大，500μl 溶液不足以完全溶解分离的 RNA，无法用分光光度计准确测定 RNA 浓度。从 RNA 母液中取出数份少量溶液进行适当稀释直至 28S 和 18S 核糖体 RNA(rRNA) 变性凝胶条带清晰可见。泳道 9～10：适当溶解的前述从人类组织分离的 RNA 样品。电泳道 11：RNA 标准分子量标准 (Promega)

RNase 污染的解剖刀片迅速将组织切成小片。不重复使用解剖刀片是明智的。虽然刀片可以重复使用，但是采用那些使用历史不清楚的解剖刀片有引入 RNase 的危险。将切碎的组织薄片转移到裂解缓冲液时，要尽量避免 PBS 溶液的引入。如果裂解缓冲液被稀释太多，其破碎组织结构的能力就会丧失。更为糟糕的是裂解缓冲液抑制 RNase 的能力也会丧失。

6.4.2　冷冻组织

如果不能马上从组织样品分离 RNA，可以将组织样品冷冻备用。如果组织样品处理得当，即可马上将所获组织在液氮中快速冷冻❶，然后于－80℃或干冰中保存备用。从这些冷冻组织分离足量高品质 RNA 用于 RNA 分析不存在困难。将新鲜组织粉碎后溶于高离液裂解缓冲液中。如果组织块体积足够小，就可以在适量的裂解缓冲液中融化，然后机械破碎。然而，如果组织要切片用于组织检测或原位杂交，先用 O. T. C。介质❷包埋，然后在低温恒温器中冷冻，最后进行组织切片。这样操作的效果比将组织快速冷冻进行切片的效果好。由于 RNA 空间分布的维持是开展原位杂交所必需的，而快速冷冻常常会破坏一些组织的 RNA 空间分布，因此用快速冷冻组织的切片进行原位杂交结果，其 RNA 空间分布数据不可靠。

一旦组织冰冻了，最好不要反复冻融。在不损伤 RNA 稳定性的情况下，冷冻也使组织切割变得非常困难。在作者的实验室，小体积至中体积快速冷冻的组织 (0.5～2g)，包裹两层厚铝箔，然后放在封口袋里于－80℃保存。当要提取 RNA 时，就把样品从超低温冰箱取出，迅速置于实验室台面上猛击❸。通常这样的操作能够很好地粉碎组织。除去铝箔后，迅速地将冷冻组织碎片转移到已经用干冰预冷过的称量盘。这样就能在样品融化前称量生物材料的重量。在此，有些人经常犯的严重错误，是让冰冻组织融化后才加入裂解缓

❶ 快速冷冻法也称为“突然冷冻”(snap-freezing)。

❷ O. T. C. 包埋介质也称为 Tissue-Tek O. T. C. 组织包埋介质。这是在低温恒温器中制备超薄切片用组织样品的标准材料。O. T. C. 也可用来将冷冻组织黏附于卡盘上，卡盘在适当位置抓住冷冻组织，把它推向保持低温的刀片。在冷冻腔里 (－22℃)，新鲜组织样品在 O. T. C. 介质中逐步冷却。

❸ 根据有关规定，进行这样的操作要戴安全眼镜、手套，穿长工作服，并且首先要保证该实验室容许这样的操作。还有，人类样本可能有病原体感染，必须在适当的隔离区域进行该操作。此警告也适宜于其他组织样品。

冲液。由于裂解缓冲液不是冰冻的，组织块在强变性的裂解缓冲液中将迅速融化，机械破坏迅速。

6.4.3　固定组织

用 10%福尔马林缓冲液或者 4%多聚甲醛溶液固定组织，是保存组织样品的一种成熟方法。尽管福尔马林固定很常见，但是它会使 RNA 回收和分析非常困难。原因之一是福尔马林固定的组织在胍盐试剂中溶解度很低。然而，有人证实用蛋白酶 K 温浴的方法，是溶解福尔马林固定组织的有效方法（Stanta 和 Schneider，1991；Masuda 等，1991）。它有助于 RNA 和 DNA 的回收（Coombs 等，1999）。在福尔马林固定的过程中，单甲醇基团（—CH_2OH）加合到四种碱基上。除去单甲醇基团（—CH_2OH）后，RNA 分子能够用于 PCR 扩增。在 TE 缓冲液中 70℃温浴 1h，能够除去 RNA 的福尔马林修饰基团（Masuda 等，1999），从而改进 RNA 反转录效率。尽管近期有人证实，新的 cDNA 合成方法和 PCR 引物设计策略，能够改进用福尔马林固定 RNA 作为模板的 RT-PCR 的灵敏性（Mikhitarian 等，2004）。但是与用新鲜组织分离的 RNA 作为模板相比，用这些固定组织所获 RNA 作为模板合成的 cDNA 比较小。一般来说，从新鲜组织或冷冻组织分离 RNA 比从固定组织分离 RNA 要容易很多。

6.5　实验方案：用氯化锂-尿素法从组织分离 RNA

下面介绍的方法，对 Auffray 和 Rougeon（1980）、Kato 等（1987）的方法进行了修改。用本方法已经成功地从各种组织（包括乳房、胰脏、肝脏、前列腺、脾脏和脑组织）中分离得到 RNA。这个方法成功的关键是组织匀浆时间短，能够在 60s 内完成匀浆。这期间将装有组织样品和裂解缓冲液的试管浸没在冰水浴（图 6.4）。本法的早期版本包括样品与蛋白酶 K 温浴的步骤，现在已经删除了。实验室用氯化锂-尿素法分离的 RNA，与用胍盐法所获得的 RNA 纯度相当甚至更好。

图 6.4　采用氯化锂-尿素法匀浆组织。在匀浆过程中，装有组织样品和氯化锂-尿素匀浆缓冲液的 50ml 锥形管置于冰浴。这是避免匀浆所产生热量的好办法。如正文所述，每次匀浆时间很短，匀浆总时间不超过 60s。在匀浆间隙锥形管也一直置于冰上

（1）预先：实验前，所有缓冲液和试管必须预冷至 4℃，保证核酸酶的活性降至最低。

① 将称量盘置于干冰上放置数分钟，使组织样品没有融化就可以精确称重。

② 将适当重量的组织迅速转移到预冷的 50ml 锥形管中，加入 10 倍体积的氯化锂缓冲液（3mol/L 氯化锂；6mol/L 尿素；50mmol/L Tris，pH 7.4；1mmol/L EDTA；100mmol/L β-巯基乙醇；0.05%*N*-十二烷基肌氨酸钠）

注意　β-巯基乙醇在使用前加入。

③ 把锥形管置于冰水浴中，用 Polytron 匀浆器或其他匀浆器匀浆组织。使用几个脉冲匀浆，总时间不超过 60s。

注意 1　匀浆过程中尽量避免起泡、产热。

注意 2 使用电动机驱动的匀浆器，所有操作必须遵照安全事项。

④ 把匀浆液转移到预冷的 15ml 聚丙烯锥形管中（每管溶液体积不超过 12ml）。将装有匀浆液的试管－20℃放置过夜。

⑤ 第二天早晨，将装有匀浆液的管子置于预冷的离心机转子内，以 5000×g 于 4℃离心 75min。

注意 确认离心机的最大转速和离心管的化学兼容性。

⑥ 离心后，小心倒出上清液，用 Kimwipe 无尘纸吸干离心管的溶液。检查是否有固化的液体贴在离心管内壁。如果有，用无菌棉签清除。不要用 Kimwipe 无尘纸把试管内壁全清理干净。进行这步操作时，离心管要一直放在冰上。

⑦ 每管加入 8～10ml 冷的 3mol/L 氯化锂，涡旋 30s。

注意 涡旋程度要足以打散沉淀物质。

⑧ 样品以 5000×g 于 4℃离心 45min。

注意 确认离心机的最大转速和离心管的化学兼容性。

⑨ 重复步骤⑥～⑧。

⑩ 将沉淀重新悬浮于 2.5ml TE 缓冲液或 SDS 缓冲液［10mmol/L Tris(pH 7.5)，0.1mmol/L EDTA，0.5% SDS］中。可用涡旋悬浮沉淀。如有必要，可用无菌的枪头吹打，分散沉淀。

⑪ 加入 150μl 5mol/L NaCl，温和涡旋混匀。

⑫ 如果第⑪步的材料是装在 15ml 聚丙烯塑料管中，加入等体积修改后的酚：氯仿：异戊醇混合液抽提（见后面的说明）。如果第⑪步的材料不是装在 15ml 聚丙烯塑料管中，必须将其转到能与这些有机溶剂相容的离心管中。盖紧塑料管盖，然后小心涡旋将样品混匀。

注意 修改后的酚：氯仿：异戊醇混合液是用等体积的 Tris-SDS 缓冲液（100mmol/L NaCl；1mmol/L EDTA；10mmol/L Tris，pH 8.5；0.5%SDS）饱和分子生物学级苯酚，然后将氯仿：异丙醇（24∶1）与等体积的 Tris 饱和的酚混合。最后，加入 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%。酚饱和的操作步骤见图 5.2 和附录 3。

⑬ 于 4℃以 1000×g 离心样品 10min。

⑭ 将上层水相移至新的聚丙烯塑料管中，切勿转移含有蛋白质界面的溶液。

⑮ 水相中加入等体积酚：氯仿：异戊醇，小心涡旋将样品混匀。

⑯ 于 4℃以 1000×g 离心样品 10min。

⑰ 将上层水相转移到新的聚丙烯塑料管中，如果有蛋白质界面层存在，切勿转移界面层。

注意 如果在水相和有机相之间有蛋白质条带，重复步骤⑮和⑯的操作，直到该界面层消失。

⑱ 最后用等体积氯仿或氯仿：异丙醇（24∶1）抽提一次。于 4℃以 1000×g 离心样品 3min。

⑲ 将上层水相移至已经在冰上预冷的不含 RNase 的 Corex[1] 玻璃管中，加入 3 倍体积的 100%乙醇。用 Parafilm 封好玻璃管。如果水和乙醇不能很好地混合，仔细而又温和地涡

[1] 玻璃管必须是高强度，能够耐受离心力。如果没有 Corex 玻璃管，可以从 Kimble-Kontes 公司购买同等质量的产品。15ml 的玻璃管货号是 45500-15，30ml 的玻璃管货号是 45500-30。如同 Corex 玻璃管，采用 Kimble 高强度管必须用适当的橡皮套包住才能离心。

旋几秒钟，不要倒置玻璃管来混合溶液。

⑳ 将玻璃管置于－20℃过夜，最大量地回收 RNA。

㉑ 将玻璃管置于合适的橡皮套管中，置于预冷的离心机转子中。于 4℃以 9000×g 离心 30min。

㉒ 离心结束后，小心倒出上清液。小心别丢失管内或管底的沉淀物。

㉓ 用 75%乙醇：25%无 RNase 的水洗涤 RNA 沉淀。用 5ml 75%乙醇：25%无 RNase 的水洗涤在 15ml Corex 玻璃管沉淀的 RNA；用 10ml 75%乙醇：25%无 RNAse 的水洗涤在 30ml Corex 玻璃管沉淀的 RNA。

㉔ 温和涡旋 Corex 玻璃管，于 4℃以 9000×g 离心 15min。

㉕ 重复步骤㉒～㉔两次，总共洗涤 3 次。

㉖ 用 5ml 无水乙醇再洗涤 RNA 沉淀一次，温和涡旋，于 4℃以 9000×g 离心 10min。

注意　用无水乙醇洗涤 RNA 能加速干燥，回收的 RNA 最大限度地避免了乙醇污染。所获得的高质量 RNA 非常有利于下游研究。

㉗ 在空气中干燥玻璃管内的 RNA 沉淀。但要当心不要将 RNA 沉淀干燥得太彻底。用无水乙醇清洗过的 RNA 沉淀，只需在空气中干燥 5min。也可以将玻璃管以一定角度倒置，于 37℃培养箱保温 2～3min，加速干燥。注意：玻璃管必须敞开，这样才能让残余的乙醇挥发干净。在培养箱中放置时，用 3～4 层 Kimwipes 滤纸置于玻璃管开口，以免玻璃管开口与培养箱金属直接接触。

㉘ 尽可能用最少体积的无菌水或 TE 缓冲液（10mmol/L Tris，pH 7.5；0.1mmol/L EDTA）悬浮 RNA。根据组织样品初始重量，彻底溶解 RNA 可能需要 500～1000μl 或更大体积的溶液。

㉙ 取 1μl RNA 溶液，用分光光度计测定 RNA 溶液浓度（见第 8 章）。然后用适量的 RNA 溶液上变性琼脂凝胶，根据电泳结果判断分离 RNA 的样品（第 10 章）。

注意　若样品在凝胶中弥散拖尾，表明 RNA 没有完全溶解（图 6.3）。

㉚ RNA 溶液分装，置于－80℃。RNA 样品可以以水溶液形式保存，也可以用乙醇重新沉淀的形式长期保存。

6.6　实验方案：从富含脂类的组织分离 RNA

从脂肪组织分离 RNA 不难。使用胍盐缓冲液破坏生物组织的结构，很容易分离 RNA。用这种方法分离 RNA 时，最麻烦的事情可能是除去脂肪组织和其他组织（如脑组织）的大量脂肪。通常，先用胍盐缓冲液（或者氯化锂-尿素匀浆缓冲液）将组织或细胞匀浆，经过简单低速离心使脂肪漂浮在离心管液面上层，把上层脂肪吸去。如果需要，重复低速离心除去脂肪的操作。另一种方法是直接将氯仿加入胍盐裂解液中，由于脂肪溶于有机相，除去有机相就可以除去脂肪。后面分离 RNA 和普通分离 RNA 操作一样，用酸性酚：氯仿抽提，然后纯化 RNA。尽管下面的方法（Chomczynski 和 Sacchi 改进法，1987）宣称能够用自制试剂分离 RNA，但是用厂家提供的试剂如 TRIzol 或 TRI 分离 RNA 可能更有信心。

① **戴手套！**

② 在冰上切碎新鲜的组织（最多不超过 100 mg）。每 100 mg 组织加入 1ml 溶液 D

[4mol/L 硫氰酸胍；25mmol/L 柠檬酸钠，pH 7.0；0.5% *N*-十二烷基肌氨酸钠；100mmol/L 2-巯基乙醇（使用前再加）]。在室温下匀浆。加入等体积氯仿抽提，简单离心分离氯仿相和水相。去除氯仿相（下层）。再加入等体积新鲜氯仿，简单离心分离氯仿相和水相。将上层水相转移到新的聚丙烯塑料管中。

③ 第②步骤的每毫升溶液 D 中，加入 0.1ml 2mol/L 柠檬酸钠（pH 5.2），1.0ml 水饱和酚（分子生物学级），0.2ml 氯仿：异戊醇（49：1）。加入每一种试剂后，盖上塑料管盖。然后小心倒置，彻底混合溶液。所有试剂加入后，再剧烈倒置 30s。

④ 冰上放置 15min，让样品冷却。

⑤ 离心分离有机相和水相。如果可能，采用微型离心管，于 4℃以 12000×*g* 离心。

⑥ 含有 RNA 的水相转移至新的离心管中，加入 0.75 倍体积冰冷的异丙醇，混合后于 20℃放置 1h 以上，沉淀 RNA。

注意 制备规模大时，采用 Corex 玻璃管。在沉淀和回收 RNA 时，用正确的橡皮套管套住 Corex 玻璃管，离心沉淀和回收 RNA。

⑦ 于 4℃以 9000×*g* 离心 10min，收集 RNA 沉淀。小心倾斜倒去上清液。

当心 在操作过程中，离心力不得超过离心管所能耐受的最大离心力。

⑧ 用 300μl 溶液 D（见步骤②）彻底溶解 RNA 沉淀。然后将 RNA 溶液转移到无 RNase 污染的 1.7ml 微型离心管中。

⑨ 加入 0.75 倍体积的异丙醇重新沉淀 RNA，于－20℃放置 1h 沉淀 RNA。

⑩ 于 4℃以最大离心速度离心 10min，收集 RNA 沉淀，小心倾斜倒去上清液。

⑪ RNA 沉淀用 70%乙醇洗 3～4 次，每次 500μl。如果在洗涤过程中 RNA 沉淀没有移动就不必重新离心。离心管的 RNA 沉淀在空气中干燥，使乙醇挥发。用 95%乙醇洗一次可加速沉淀的干燥。

⑫ 用 TE 缓冲液或是经 DEPC 处理的水重新溶解 RNA，体积要尽量少。于 65℃温浴 10 min 可以加速 RNA 溶解，但是如果乙醇洗涤后的 RNA 沉淀没有彻底干燥，就没必要在 65℃温浴。用乙醇沉淀的形式保存 RNA 备用。确定 RNA 浓度后，将 RNA 溶液分装，保存于－80℃。避免 RNA 样品的反复冻融。

6.7 纯化嵌合在多核糖体的 mRNA

尽管 mRNA 是检测基因表达的一个优秀指标，但是必须开展多方面的检测才能充分评价细胞内基因表达的生物化学。标准的 RNA 分离技术，即使与 PCR 相结合，也只能揭示细胞裂解时刻一些 RNA 的稳态含量，并不能反映 mRNA 的翻译水平。

为了更清楚地不止从一个方面来确定基因表达调控，收集并分析那些已经进入翻译机制[即核糖体（多核糖体部分）]的 mRNA 能相对精确地反映基因表达过程中能够进行翻译的 mRNA 水平。因此分离多核糖体嵌合的 mRNA，可以在翻译水平研究基因表达。简而言之，分析从细胞或组织分离的与多核糖体结合的 mRNA 能够确定哪种 mRNA 被翻译，以及该 mRNA 的翻译效率。

早在 20 世纪 70 年代初期，文献中就有用免疫沉淀法特异沉淀核糖体的报道（Palacios 等，1972；Schlechter，1973；Palmiter，1974）。几年后，亲和柱技术的应用改进了核糖体免疫沉淀法（Schultz 等，1977）。在利用这种方法有效地富集核糖体结合 mRNA 的研究实

例中，更为显著的例子是利用表位特异性的单克隆抗体分离出编码人类白细胞抗原(HLA)-DR 相溶性抗原重链的 mRNA（Shapiro 和 Young，1981；Korman 等，1982）。紧接着用多价血清成功地分离出鼠肝编码胱硫醚合成酶的 mRNA（Kraus 和 Rosenberg，1982）和牛肾脏细胞编码低密度脂蛋白受体的 mRNA（Russell 等，1983）。总的来说，由于免疫用抗原被糖基化或者被加工为成熟的形式，与正在翻译的新生蛋白质的性质不同，所以用抗体免疫沉淀多聚核糖体难度大，成功的实例不多。

现在基本上所有实验室都使用 PCR 技术，人们不再喜欢用免疫沉淀法富集特异的 mRNA。利用网络数据库协助引物设计，降低了 PCR 扩增的非特异性。现在的标准方法是，将所有的多核糖体沉淀下来，从而捕获到正在活跃地翻译的 mRNA，然后除去核糖体和翻译辅助因子。纯化的核糖体 mRNA，可以用作反转录合成制备芯片分析的探针（第 23 章），可以用基因特异引物 PCR 进行检测，或者用通用引物构建 cDNA 文库。

6.7.1　实验方案：嵌入多核糖体的 mRNA 的提取

① **戴手套！**整个操作必须遵循无 RNase 的技术。

②a 组织样品：各个样品的原始质量肯定是不一样的，这取决于组织的可利用性。每毫克组织样品要使用 10μl 的匀浆缓冲液（25mmol/L NaCl；5mmol/L $MgCl_2$；25mmol/L Tris，pH7.5；2.0% Triton X；1mg/ml 肝素）。在冰上，用合适大小的配有松弛的研棒的杜恩斯匀浆器匀浆组织。然后进行第③步操作。

②b 培养细胞：常规方法收集细胞（见附录 10）。很重要的操作是用冰冷的 PBS 缓冲液洗涤单层培养细胞，并用使用过的细胞培养液抑制胰蛋白酶的活性。每 10^6 个细胞用 10μl 的匀浆缓冲液（25mmol/L NaCl；5mmol/L $MgCl_2$；25mmol/L Tris，pH7.5；2.0% Triton X；1mg/ml 肝素），所有离心都在 4℃进行。

注意 1　如第 4 章所叙，终浓度为 200U/ml 的 RNasin 可替代肝素，用于抑制 RNase 活性。

注意 2　在整个分离过程中，为了维持核糖体的整体性，在收集细胞之前 15min 内，加入环己亚胺至 100μg/ml，防止 mRNA 捕获之前多聚核糖体的解体。

③ 将匀浆液转移到合适的无 RNase 活性的离心管中。若匀浆液体积大，将匀浆液转移到 Corex 玻璃管中，别忘了在离心时要将 Corex 玻璃管置于合适的橡皮套管中。若匀浆液体积小，用无 RNase 污染的微型离心管。无论大体积还是小体积，都是在预冷的转子中于 4℃以 9000×g 离心 5min。

④ 离心样品时，将 50ml 无菌锥形管置于冰上预冷。

⑤ 第③步离心之后，小心地将上清液倒至预冷的离心管中。根据匀浆液的原始体积，有时可能要将上清液分装至两个离心管，以便能够装入后续操作步骤的试剂。

⑥ 加入 1.2 倍体积的匀浆缓冲液（25mmol/L NaCl；200mmol/L $MgCl_2$；25mmol/L Tris，pH7.5；2.0% Triton X；1mg/ml 肝素或 200U/ml RNasin）。冰浴 2h。

⑦ 冰浴后，在 15ml 硅烷化的无菌的 Corex 玻璃管中加入 3.5ml 多聚核糖体缓冲液(25mmol/L NaCl；200mmol/L $MgCl_2$；25mmol/L Tris，pH7.5；1mol/L 蔗糖)，然后加入第⑥步的混合液 10ml。

注意　硅烷化方法见附录 8。

⑧ 在预冷的离心机转子中，于 4℃以 9000×g 离心 15min。

⑨ 小心倾斜倒去上清液，注意不要丢失多聚核糖体沉淀。

⑩ 用 1ml HEPES-SDS 缓冲液（0.1mol/L NaAc；10mmol/L HEPES，pH7.5；0.5% SDS）重新悬浮多聚核糖体沉淀。如果需要可以增加缓冲液体积，彻底溶解多聚核糖体沉淀。

⑪ 如果第⑩步得到的多聚核糖体体积不超过 1ml，将多聚核糖体溶液全部转移到一个 2.2ml 微型离心管中。如果第⑩步得到的多聚核糖体体积超过 1ml，将多聚核糖体溶液分两管转移到 2 个 2.2ml 微型离心管中。

⑫ 每管中加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）。盖紧管盖，小心混合。然后以 10000×g 离心 5min 使溶液分相。

注意 如果抽提中使用的离心管比较大，注意不要超过该离心管所能耐受的最大离心力。

⑬ 将上层水相移至新的离心管中，重复第⑫步操作。

⑭ 将上层水相移至新的离心管中，加入等体积的氯仿或氯仿：异丙醇（24：1）进行抽提。于 4℃以 10000×g 离心 1min，使溶液分相。

⑮ 将水相转移至能够耐受 9000×g 离心力的体积更大的离心管中，如硅烷化的 Corex 玻璃管。如果第⑪步操作所获液体分成数份，此时可以将相同样品混合。

⑯ 加入 0.08 倍体积 3mol/L NaAc(pH5.2) 和 2 倍体积的 100%乙醇。混合后，于－20℃放置 2h 以上，沉淀 RNA。为了最大限度地回收 RNA，将该溶液于－20℃放置过夜。

⑰ 于 4℃以 9000×g 离心 20min，收集 RNA。

⑱ 小心地倒去乙醇，当心不要倒掉管内或管底的 RNA 沉淀。

⑲ 用 75%乙醇（100% 乙醇用 DEPC 处理的水稀释）洗涤 RNA 沉淀 2 次。

⑳ 用 100%乙醇再洗涤 RNA 沉淀一次，能够加速 RNA 沉淀在空气中的干燥。不要让 RNA 沉淀彻底干燥。

㉑ 将 RNA 沉淀溶解于最小体积的无菌水。温和涡旋有助于 RNA 的溶解。如有必要，在 65℃温浴 2min 加速 RNA 溶解，然后再温和涡旋。

㉒ 如果溶液体积小，于 4℃以 12000×g 离心 15min。如果使用 Corex 玻璃管，则于 4℃以 9000×g 离心 30min。

㉓ 将含有纯化 RNA 的上清液转移到一个新的管子中。用第 8 章所介绍的方法检测 RNA 溶液的含量和纯度。将 RNA 溶液分装，于－80℃保存。

6.8 实地采集生物样品

RNAlater（Ambion）是一个非常重要的化合物，该化合物给组织样品保存方式带来了革命性的进步，使所保存的样品能够在日后的任何时间和地点进行 RNA 分析。这种产品是特殊的水溶液。从事 RNA 研究工作的人都知道，该化合物能够阻止生物组织或器官内 RNA 的降解，将生物组织和器官内的 RNA 保存到研究人员认为方便的时间和地点，再从生物材料中分离出高质量的 RNA。RNAlater 的化学特征有利于生物样品的采集，尤其是在野外工作场所采集样品。另外，尽管生物材料可以在液氮中快速冷冻，但是一般来说运输一个即使是很小的液氮瓶也是不现实的，尤其是研究人员计划在野外工作几天的情况下用液氮快速冷冻生物样品就更不现实。

6.9　RNA“净化”方法

不论是从新鲜的、冷冻的、还是固定的组织分离 RNA，所分离的 RNA 总含有少量残留蛋白质，以及作为分离操作组分的化合物污染。这些污染物会对后续的 RNA 应用产生负面影响。如果电泳图谱表明新近分离的 RNA 纯度好，但用于反转录合成 cDNA 或杂交实验的效果很差，就要进行 RNA“净化”。RNA 净化的方式很多。例如，增加溶解 RNA 的无菌水或 TE 缓冲液体积，然后用本章和第 5 章所介绍的方法用等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提。将 RNA 溶液和有机溶剂混合后的总体积控制在 1.5ml 以内是明智的，这样抽提操作可在一个 1500μl 的微型离心管中进行。离心后，在有机相和水相之间出现一条白色的条带，表明 RNA 溶液还有蛋白质污染。水相再次用等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提，直至有机相和水相之间白色条带消失（即所有蛋白质都被去除）为止。最后用等体积的氯仿或氯仿：异丙醇（24：1）抽提上层水相一次，去除水相残余的苯酚，因为后者会氧化成有害的醌。接下来，重新沉淀 RNA，检测沉淀 RNA 的质量。

另外，还有一些硅胶离心柱可用于 RNA 净化。这种柱子内的硅胶在高盐的离液条件下与 RNA 结合。几乎所有分子生物学试剂供应商都能提供这样的柱子。柱层析将 RNA 与所有其他化学品或化合物分开；然后用低盐的缓冲液或无菌水将纯化 RNA 从柱中洗出。尽管要用硫氰酸胍作为离液剂，但是这种方法速度快，而且不用任何有机溶剂。

RNA“净化”也意味着除去了 RNA 溶液的基因组 DNA 或线粒体 DNA 污染。前面提到，进行 RNA 分离用到更为剧烈的破坏所有器官的方式，这样 DNA 也会释放到匀浆液中。如同附录 5 所介绍的，大多数实验室用 DNase Ⅰ处理从组织分离的 RNA 溶液，从而消除 RNA 溶液的 DNA 污染。这样处理后，研究人员不用担心 PCR 过程中基因组 DNA 和 cDNA 之间竞争，也不用担心印迹分析中污染 DNA 会产生杂带。

最后，应该认识到有些组织，有过量的天然化合物可能与 RNA 共纯化。明显的例子是肝组织的糖原与 RNA 共纯化，以及脂肪组织的脂类与 RNA 共纯化。前一种情况下，加入 3 倍体积的 4mol/L 乙酸钠［pH 7.0（不是 5.2）］，于－20℃放置过夜沉淀 RNA，而糖原则滞留在溶液中（Sambrook 等，1989）。根据离心管大小，于 4℃在 8000×g 以上离心 15min 收集 RNA。另外，将 4mol/L 氯化锂加入含有糖原污染的沉淀 RNA 中并分散沉淀团块，然后根据离心管大小，以 3000×g～5000×g 离心 10min 收集 RNA，也能除去 RNA 溶液的糖原污染（Puissant 和 Houdebine，1990）。在后一种情况下，用前面已经详细介绍的方法除去过量的脂类。

经验：要留心各种分离 RNA 操作的细节，才可能获得质量最高的 RNA。尽可能减少操作的次数，将偶尔引入 RNase 的风险降至最低，从而有助于 RNA 的最大稳定性，是进行 RNA 分离的明智之举。

6.10　参考文献

Auffray, C., and Rougeon, F. (1980). Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* **107,** 303.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162,** 156.

Coombs, N. J., Gough, A. C., and Primrose, J. N. (1999). Optimization of RNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.* **27,** e12.

Fend, F., Emmert-Buck, M. R., Chuaqui, R., Cole, K., Lee, J., Liotta, L. A., and Raffeld, M. (1999). Immuno-LCM: Laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am. J. Pathol.* **154,** 61.

Kato, N., Pfeifer-Ohlsson, S., Kato, M., Larsson, E., Rydnert, J., Ohlsson, R., and Cohen, M. (1987). Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: Two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J. Virol.* **61,** 2182.

Korman, A. J., Knudsen, P. J., Kaufman, J. F., and Strominger, J. L. (1982). cDNA clones for the heavy chain of HLA-DR antigen obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70,** 1844.

Kraus, J. P., and Rosenberg, L. E. (1982). Purification of low-abundance messengers RNAs from rat liver by polysome immunoadsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79,** 4015.

Kuecker, S. J., Jin, L., Kulig, E., Oudraogo, G. L., Roche, P. C., and Lloyd, R. V. (1999). Analysis of PRL, PRL-R, TGF -R11 gene expression in normal and neoplastic breast tissues after laser capture microdissection. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **7(3),** 193.

Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., and Okubo, K. (1999). Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* **27,** 4436.

Mikhitarian, K., Reott, S., Hoover, L., Allen, A., Cole, D. J., Gillanders, W. E., and Mitas, M. (2004). Enhanced detection of RNA from paraffin-embedded tissue using a panel of truncated gene-specific primers for reverse transcription. *BioTechniques* **36,** 474.

Palacios, R., Palmiter, R. D., and Schimke, R. T. (1972). Identification and isolation of ovalbumin-synthesizing polysomes. I. Specific binding of ^{125}I-anti-ovalbumin to polysomes. *J. Biol. Chem.* **247,** 2316.

Palmiter, R. D. (1974). Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **13,** 3606.

Puissant, C., and Houdebine, L. (1990). An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques* **8,** 148.

Russell, D. W., Yamamoto, T., Schneider, W. J., Slaughter, C. J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1983). cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: Feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80,** 7501.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed, p. 7.22. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schechter, I. (1973). Biologically and chemically pure mRNA coding for a mouse immunoglobulin L-chain prepared with the aid of antibodies and immobilized oligothymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70,** 2256.

Schultz, G., Kieval, S., Groner, B., Sippel, A. E., Kurtz, D. T., and Feigelson, P. (1977). Isolation of specific messenger RNA by adsorption of polysomes to matrix-bound antibody. *Nucleic Acids Res.* **4,** 71.

Shapiro, S. Z., and Young, J. R. (1981). An immunochemical method for mRNA purification. Application to messenger RNA encoding trypanosome variable surface antigen. *J. Biol. Chem.* **256,** 1495.

Stanta, G., and Schneider, C. (1991). RNA extracted from paraffin-embedded human tis-

sues is amenable to analysis by PCR amplification. *BioTechniques* **11,** 304.

Suarez-Quian, C. A., Goldstein, S. R., Pohida, T., Smith, P. D., Peterson, J. I., Wellner, E., Ghany, M., and Bonner, R. F. (1999). Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *BioTechniques* **26,** 328.

（刘建华　王剑译；金由辛校）

第7章　多聚腺苷酸RNA的分离

7.1　基本原理

为什么要纯化信使RNA（mRNA）？为了充分地回答这个问题，必须对转录的各样产物及其数量做出统计学考虑。根据细胞内一种RNA的平均拷贝数将真核mRNA分成高丰度mRNA、中丰度mRNA和低丰度mRNA。

高丰度mRNA[1]指一个细胞浆中有数百个拷贝的mRNA。如果高度分化的细胞执行某种特定的功能或者产生大量的特定蛋白质，那么有理由推定该细胞转录了相应的高水平信使RNA[2]。例如，人们用网状细胞和输卵管细胞分别克隆β-球蛋白（Efstratiadis等，1976）和卵清蛋白（Buell等，1978）。中丰度mRNA指一个细胞浆中含有几十个拷贝的mRNA。许多标准的看家基因（例如，组蛋白、β-肌动蛋白、GAPDH）的mRNA属于中丰度mRNA，常作为RNA分析的对照或参照。低丰度mRNA指一个细胞浆中仅有14个拷贝或更少拷贝的mRNA（Williams，1981），这就是所谓的稀有mRNA。采用超级灵敏的检测技术，如聚合酶链反应（PCR），大大促进了这些稀有mRNA的检测。估计至少30%的细胞mRNA属于低丰度mRNA。而且，将那些低于1个拷贝/细胞的mRNA定义为非常低丰度mRNA，这意味着必须在一个混合的细胞群中才能检测到这些非常低丰度mRNA。

纯化mRNA的目的是增加一个生物样品中某种、几种或所有mRNA在统计学上的代表性。各种纯化策略的本质都是富集RNA样品。普通的富集技术包括在细胞裂解前处理生物材料，以便反复诱导或积累细胞中某种类型的基因转录产物；也可以对以前已经纯化的RNA样品进行适当处理达到特定RNA富集的目的。对样品进行富集有利于mRNA研究，原因如下（但不仅限于这些）：①减少了Northern分析、S1核酸酶分析或核糖核酸酶保护分析等特定基因转录产物检测所必需的RNA量，同时增加了检测的灵敏度；②有利于将mRNA转化成互补DNA（cDNA）[3]。增加统计意义上的代表性可以提高那些不易检测的稀有mRNA分子的印迹检测、文库筛选或反转录聚合酶链反应（RT-RNA）的成功率。然而，必须清楚，如果优化使用的试剂和技术，相关的试验可能不用纯化的mRNA（而采用总RNA），尽管人们希望采用纯化的mRNA。

---

[1] 应该注意其他非mRNA的转录产物属于细胞内高丰度RNA，尤其是核糖体RNA（rRNA）和转移RNA（tRNA）。

[2] 高丰度mRNA可能是多拷贝基因（如基因重复）的转录产物，这是细胞需要大量某种基因产物时所采用的一种策略。

[3] cDNA合成可以用于传统的文库构建、PCR定量转录产物、微阵探针合成，或者其他相关的目的。

7.2　多聚腺苷酸化

人们知道 poly(A) 尾巴已经有好几年了。RNA 的 poly(A) 尾巴是一串腺嘌呤核苷酸。大多数（但不是所有的）真核 mRNA 分子的 3′末端有 poly(A) 尾巴。多聚腺苷酸化的过程就是把 poly(A) 尾巴添加到 mRNA 3′末端。多聚腺苷酸化与转录终止不直接偶联（Darnell，1979；Maney，1988），而是由细胞核内一个酶系（Moore 和 Sharp，1985）催化完成，这类酶统称为 poly(A) 聚合酶。因此，体内多聚腺苷酸化不是转录的一个部分，而是一个转录后的调节事件，其速度很快（Nevins 和 Darnell，1978）。

poly(A) 尾巴的长度是可变的，即使从相同基因位点转录合成的 RNA 分子，其 poly(A) 尾巴长度也不相同。哺乳动物 poly(A) 尾巴长度可以在 50～300 核苷酸范围内变化，但是典型的 poly(A) 尾巴长度有 200～250 核苷酸。总体来说，带有 poly(A) 尾巴的 RNA 分子统称为 poly(A)$^+$ mRNA，准确地说是 mRNA 被多聚腺苷酸化。尽管 poly(A) 尾巴的准确功能还不清楚，但是人们认为 poly(A) 尾巴能够：①促进成熟 mRNA 运出细胞核（细胞核质运输）；②调节 mRNA 在细胞质中的稳定性和功能（综述见 Ross，1995），而细胞质是 mRNA 翻译的场所。下面的观察资料支持上面假设的 poly(A) 尾巴功能：①抑制核 RNA 的多聚腺苷酸化的腺苷类似物 3′-脱氧腺苷（cordycepin）能够降低已转录的、非多聚腺苷酸化的序列在细胞质的水平；②mRNA 分子的半衰期可以根据其 poly(A) 尾巴的长度预测。在体内，poly(A) 特征和 poly(A) 结合蛋白（PABP）密切相关。每 10～20 个碱基长度的 poly(A) 尾巴能化学定量地结合一个 PABP（综述见 Kramer，1996），在细胞核内和细胞质内也观察到这种化学定量结合。poly(A) 尾巴和 PABP 之间的相互作用有利于 mRNA 抵抗 3′→5′核酸酶的攻击。当然，大多数 RNA 分离方法都会使 PABP 及其他蛋白质与结合的 RNA 分离。

3′-poly(A) 尾巴的产生实际上是两种酶活性连续作用的结果，即前体 RNA(hnRNA) 先发生裂解，然后进行多聚腺苷酸化。很清楚，最初的 RNA 转录产物除了多聚腺苷酸信号外还有数以千计的核苷酸（Nevins 和 Darnell，1978；Ziff，1980）。前体 RNA 分子不是由核酸外切酶从 3′末端逐步降解，而是经核酸内切酶消化形成了 poly(A) 尾巴添加的精确位点（Nevins 和 Darnell，1978）。裂解后，依次添加腺苷酸残基，最终形成 poly(A) 尾巴。

在多聚腺苷酸化之前进行的剪接不是偶然事件。剪接的效率和剪接地点都被多聚腺苷酸化信号精确调控。在更高级的真核生物中，事实上所有多聚腺苷酸化的 mRNA 分子都有高度保守的 6 个核苷酸模块 5′…AAUAAA…3′，或者是与该模块密切相关的变异序列。这个模块典型地位于多聚腺苷酸化起始位点上游 30 个核苷酸以内（Proudfoot 和 Brownlee，1976）。为了有效地剪接和多聚腺苷酸化，还需要第二个元件，即下游富含 GU 簇（Gil 和 Proudfoot，1984；McDevitt 等，1984；Sadofsky 和 Alwine，1984；Cole 和 Stacy，1985；Conway 和 Wickens，1985）。这个富含 GU 的序列比 AAUAAA 模块还要保守，位于内切酶酶切位点下游大约有 10～40 个核苷酸区域。剪接和后续的多聚腺苷酸化是通过核酸内切酶组分、一个 GU 丰富区结合因子和 poly(A) 聚合酶构成的异源多聚体复合物的形成来完成的（Takagaki 等，1988）。

7.3　poly(A) 的解释说明

也许本章最重要的内容是阐明针对 poly(A) 尾巴亲和层析纯化 mRNA。尽管多数真核 mRNA 已经被多聚腺苷酸化，但是还有一小部分 mRNA 没有被多聚腺苷酸化。因此，分离

poly(A) mRNA 会漏掉非多聚腺苷酸化的 mRNA 分子，后者在特定的相关研究中可能很有意义。

实例 1：Northern 分析 poly(A)$^+$ mRNA 不能定性和定量测定细胞内或细胞质 poly(A)$^-$ mRNA（如组蛋白 mRNA）。如果同一位点的转录产物经过选择性转录后加工，产生了多聚腺苷酸化的和非多聚腺苷酸化的转录产物，这种情况就更加复杂。

读者要当心，那些声称通过 poly(A) 尾巴筛选“总 mRNA”的试剂盒将不能产生 poly(A)$^-$ mRNA。而且由于 poly(A) 尾巴是在细胞核内添加的，毫无疑问从整个细胞裂解物筛选的 poly(A)$^+$ mRNA 包括多聚腺苷酸化的细胞质 RNA(mRNA) 和多聚腺苷酸化的细胞核 RNA(hnRNA)。这两种 RNA 的混合物不能作为有功能的 mRNA（即能被翻译的）的代表。记住有大量的 hnRNA 从来就不能被加工成成熟的细胞质 mRNA，最终在核内降解。为了将注意力更集中于细胞产生的 poly(A)$^+$ mRNA，可以用低渗的 NP-40 缓冲液处理细胞（第 5 章），除去完整的细胞核，从细胞液分离多聚腺苷酸化 RNA。另外，为了确定那些能被翻译的 mRNA，可以制备嵌合了 mRNA 的多核糖体（第 6 章），然后用乙二胺四乙酸（EDTA）处理，释放 RNA。EDTA 能够螯合 Mg^{2+}，导致核糖体解离成单个的亚基，同时释放正在翻译的 RNA（Aziz 和 Munro，1986；Meyuhas 等，1987；综述见 Pierandrei-Amaldi 和 Amaldi，1994）。这种方法和更新的策略（Meyuhas 等，1996）对于有活性 mRNA 的识别是非常有用的。

实例 2：合成 cDNA 以及用这些 cDNA 构建文库的经典途径都是从 poly(A)$^+$ mRNA 分离开始的。为了起始 mRNA 转化成第一条 cDNA 链，oligo(dT) 引物与 poly(A)$^+$ mRNA 模板退火，在合适的方向上提供 3′-OH 基团。这类引物是各类聚合酶活性所必需的。此时反转录酶[1]合成第一条 cDNA 链。这种方法总的结果是从 mRNA 3′末端合成 cDNA。科学家应该意识到通过这种方式制备的 cDNA 文库不包括相应的 poly(A)$^-$ mRNA克隆。为了克服用 oligo(dT) 引物合成 cDNA 文库的潜在缺点，很多更新的文库采用随机引物合成第一条 cDNA 链。有时在同一个反应管里同时用随机引物和 oligo(dT) 合成第一条 cDNA 链，这种方法现在是作者实验室进行反转录合成第一条 cDNA 链的标准操作。简而言之，一些序列随机的六聚体或九聚体与热变性的 RNA 退火。退火可以有效产生多个引物的 3′-OH，这些引物的 3′-OH 同时引导反转录酶进行 DNA 延伸。这些引物不受 RNA 分子 3′末端有无 poly(A)$^+$ 尾巴影响。除非添加了 oligo(dT) 引物，否则，用这种方式合成的 cDNA 就没有与 poly(A) 尾巴相应的序列。通常用随机引物可以合成更多序列全长的 cDNA，因此有利于用经典的或现代的方法分析 mRNA。如果用几年前构建的文库进行筛选，了解文库构建时所采用的 cDNA 合成引物可能有助于实验结果的解释[2]。

总的来说，用 poly(A)$^+$ RNA 有优点也有缺点（表 7.1）。必须根据研究所需达到的灵敏度、能够获得的细胞数量或组织的重量，权衡利弊，确定是采用 poly(A)$^+$ RNA 还是总 RNA。多数情况下，应用细胞总 RNA 试一试，然后确定是否需要纯化 poly(A)$^+$ mRNA。

---

[1] 反转录酶是依赖 RNA 的 DNA 聚合酶，其作用在第 18 章重点讨论。

[2] 一些极端的例子是在 cDNA 合成之前用 poly(A) 聚合酶处理总 RNA，使所有 RNA 多聚腺苷酸化！该操作既不必需，也不推荐。

表 7.1　poly(A)$^+$ 纯化的优点和缺点

优点
poly(A)$^+$ 纯化增加了 mRNA 在总 RNA 中的比例；
poly(A)$^+$ 纯化最大限度地减少了 rRNA 和 tRNA 的干扰；
poly(A)$^+$ 纯化增加了检测的灵敏度；
目前 poly(A)的捕获方法不需再次沉淀样品就能显著地浓缩样品；
纯化的 poly(A)$^+$ mRNA 可以直接使用；
收集和沉淀的 poly(A)$^-$ RNA 可以作为优秀的阴性对照，尤其是印迹分析的阴性对照
缺点
poly(A)$^+$ 的分离丢失了 poly(A)$^-$ mRNAs；
在纯化过程中 poly(A)$^+$ RNA 的损失可能更加降低了稀有 mRNA 的比例，尤其是用总 RNA 分离 poly(A)$^+$ RNA；
受细胞裂解方法的影响，分离的 poly(A)$^+$ mRNA 也可能含有多聚腺苷酸化的 hnRNA；
oligo(dT)基质价格昂贵；
即使过去 5 年内用 poly(A)$^+$ mRNA 克隆和 RT-PCR 改进了效果，但是用 poly(A)$^+$ mRNA 可能并不是必需的

注：mRNA—信使 RNA；rRNA—核糖体 RNA；RT-PCR—反转录聚合酶链反应；tRNA—转移 RNA。

7.4　多聚腺苷酸化 mRNA 的分离

mRNA 分子多种多样，而且 mRNA 只占细胞总 RNA 重量的一小部分，用微量组织样品或细胞常常不能采用经典途径（如琼脂糖凝胶电泳或蔗糖密度梯度离心）进行 mRNA 层析。与此相反的极端情况是，如果检测和生物物理研究需要大量材料也不能用凝胶纯化 RNA。但是，柱层析分离水平可以达到毫克数量级。

为了从非多聚腺苷酸化 RNA 分离多聚腺苷酸化 RNA，可以利用腺嘌呤和胸腺嘧啶之间的自然结合力氢键从细胞质 RNA 或细胞总 RNA 分离相当少的 poly(A)$^+$ mRNA。这种方式进行的分离是一个很好的亲和层析实例（即基于生物活性或结构进行的分离或层析）。此时的生物结构是 poly(A) 尾巴。过去曾经利用不同的 oligo(dT)-纤维素亲和纯化 poly(A)$^+$ mRNA，这种纤维素是寡聚脱氧胸苷酸 [oligo(dT)] 的 5′-磷酸与纤维素珠共价交联（Aviv 和 Leader，1972）。因此，poly(A) 尾巴和 oligo(dT) 形成氢键，使 poly(A)$^+$ mRNA 保留在固相基质上。尽管现在使用 oligo(dT)-纤维素分离 poly(A)$^+$ mRNA 的人不多，但是还有一些厂家能够提供结合容量和纯化能力不同的各种型号的 oligo(dT)-纤维素。也许可以用 Gilham（1964）当初所介绍的方法合成 oligo(dT)-纤维素，但风险很大。虽然已经证明用 oligo(dT)-纤维素能相当有效地分离 poly(A)$^+$ mRNA，但是人们更乐于采用后来介绍的新方法。这些新方法所需生物样品量很少。

虽然分离 poly(A)$^+$ mRNA 的机制发生了改变，但是这些分离 poly(A)$^+$ mRNA 的方法仍然是亲和分离。这些方法简化了以前繁琐的曾经被称为“过 oligo(dT) 柱”（后面有讨论）的操作。这些较新的方法如下。

① 直接在微型离心管中将 oligo(dT)-纤维素和总 RNA 混合，不需要等 oligo(dT)-纤维素装柱后才加入总 RNA。

② 使用与 oligo(dT) 共价结合的磁珠。溶液杂交后，用磁铁捕获杂交的核酸。

③ 利用生物素和生物素亲和素的天然亲和力：生物素与核酸或其他各种分子共价结合并不改变这些分子的生物活性。生物素与链霉亲和素的结合力很大，达到 $K_d = 10^{-15}$ mol/L。如此强的结合力使很多应用都有了可能性。其中一种应用是生物素标记的 oligo(dT) 分子和 poly

(A)$^+$mRNA 碱基配对后，与链霉亲和素形成复合物沉淀。另外一种应用是用链霉亲和素交联的磁珠回收 poly(A)$^+$mRNA。洗脱体积小、操作方便、不需要进行核酸沉淀。可以利用的 RNA 纯化试剂盒本质上都采用了这个方法，只是在有些地方对该方法进行了一定的修改。

④ 将 RNA 样品过 poly(U) 琼脂糖柱，能够促进柱的基质与 RNA 样品中所有的 poly (A)$^+$mRNA 之间形成 A：U 氢键。

不管采用什么方案亲和纯化 poly(A)$^+$mRNA，最重要的是操作体积尽可能最小，即尽可能使样品的浓度处于最浓状态。

很清楚，纯化 poly(A)$^+$mRNA 的各种亲和技术，其共同点是在高离子强度的缓冲液里 poly(A)$^+$mRNA 与亲和基质退火后结合。这一点对于消除目标 RNA 和基质交联的胸苷酸残基之间的静电斥力是必需的。在高盐条件下，单价的阳离子能抵消多聚核苷酸磷酸二酯骨架的负离子。在低盐环境中，静电斥力足以阻止碱基之间的配对，从而能够以这种方式纯化 poly(A)$^+$mRNA。

随着盐离子浓度增加，oligo(dT) 基质的结合能力也提高（直到 500mmol/L NaCl、KCl 或 LiCl)[1]。在同等浓度时，KCl 或 LiCl 促进基质结合能力的作用比 NaCl 的促进作用显著（Mercer 和 Naora，1975)。必须注意，虽然盐浓度提高能够促进基质结合 RNA 的能力，但是也增强了核酸与基质的非特异性杂交。用盐离子浓度不太高的缓冲液冲洗，除去没有杂交的非 poly(A)$^+$RNA；然后用非常低的盐离子浓度的缓冲液将杂交的 poly (A)$^+$mRNA 洗脱回收。除去单价阳离子能够重构核酸之间的静电斥力，加速杂交 RNA 与基质的解离。这种方式分离的 poly(A)$^+$RNA 和 poly(A)$^-$RNA 都可以用盐和乙醇进行沉淀。poly(A)$^-$RNA 是很好的杂交分析和 cDNA 合成的阴性对照（分别在第 14 章和第 18 章进行介绍)。

7.5 用磁珠技术纯化 poly(A)$^+$RNA

与各种配基共价交联的是铁珠，已经成为从各种复杂的混合物分离不同化合物的宝贵工具。这些配基包括抗体和寡胸苷酸。抗体用来识别并结合细胞表面的抗原，而寡胸苷酸用来回收多聚腺苷酸化 RNA。有几家公司生产磁珠类产品，其中 Dynabeads olido(dT) 是 Dynal 公司的产品（Dynal，Inc.，Lake Success，NY)。Dynabeads 是超磁珠，直径 2.8μm，用聚苯乙烯包裹着氧化铁（Fe_2O_3）颗粒。在磁场中这些颗粒会形成磁极。通过 5′连接基团将 25 个核苷酸长的寡聚脱氧胸苷酸共价交联于磁珠表面。在高离子强度条件下，将磁珠加到总 RNA 混合物中有利于多聚腺苷酸化 RNA 和连接在磁珠上的 olido(dT) 引物之间的杂交（图 7.1)。杂交动力学与在溶液状态的游离分子一样，5min 内完成杂交。将样品管靠近磁铁，富集磁珠和杂交了的 poly(A)$^+$RNA（图 7.2)。接着的标准组合模式是提高温度和采用极低盐离子浓度缓冲液洗涤和洗脱。用磁珠捕获法分离多聚腺苷酸化 RNA 不需要传统的亲和柱层析，使核酸层析分离达到了新水平。这个技术最主要的优势是分离速度快，能够获得纯的、高浓度的完整 poly(A)$^+$RNA。这种方法不需要重新沉淀浓缩 poly(A)$^+$RNA。而重新沉淀常常会进一步损失独特的或低丰度的 poly(A)$^+$RNA。磁珠的平均结合容量是每毫克磁珠可结合 2μg poly(A)$^+$RNA。用这种方法纯化的 poly(A)$^+$RNA 可以直接用于 cDNA

[1] 见生产厂的包装，上面有每个等级的详细介绍和许多寡核苷酸（dT）分离基质。

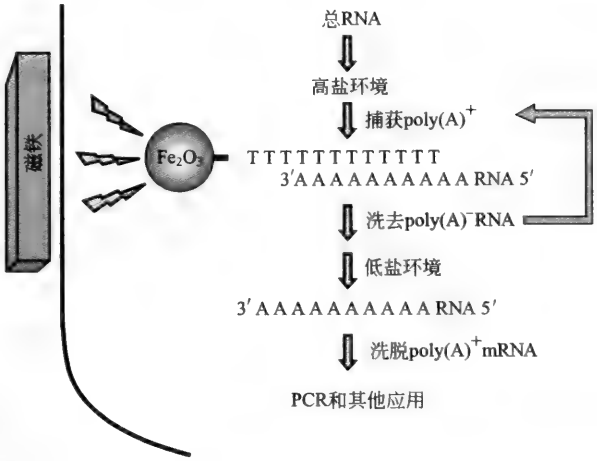


图 7.1　用磁珠分离 poly(A)$^+$ RNA 的技术。在微型离心管中，将早先纯化的 RNA 或整个细胞裂解液与 oligo(dT) 交联的磁珠在高盐条件下混合。在 poly(A) 尾巴和寡聚胸苷酸退火后，离心管紧靠磁铁将多聚腺苷酸化 mRNA 捕获到离心管壁。洗去非腺苷酸化 RNA 后，用体积非常少的低盐缓冲液或无菌水将纯化 mRNA 洗脱。这个方法与任何方法分离的动植物 RNA 兼容

文库构建、核酸酶保护分析、引物延伸、RT-PCR 扩增、体外翻译、RNA 印迹等。

下面介绍 Dynabeads 分离多聚腺苷酸化 RNA 的操作步骤。起始的生物样品材料是：①以前已纯化的总 RNA（细胞或总细胞质的总 RNA）；②培养基上生长的培养细胞或固体组织。多数情况下起始的生物样品材料的量有限，认识这一点很重要。因此，谨慎起见，可能会将磁珠直接加入整个细胞裂解液或组织匀浆液直接获得 poly(A)$^+$ RNA。考虑到基因调控要么在转录时，要么在转录后，研究人员还要清楚寡聚脱氧胸苷酸识别和捕获的是具有 poly(A) 结构的 mRNA 和 hnRNA，而不能捕获没有 poly(A) 结构的 mRNA。成功使用该技术的关键有两点：①在进行下一步操作之前必须彻底除去盛有磁珠的离心管中所有的缓冲液；②只有在离心管靠近磁铁时才能除去装有磁珠的管中的液体。

图 7.2　与磁珠交联的 oligo(dT) 碱基配对后，poly(A)$^+$ RNA 被磁性捕获。Dynal，Inc. 提供

最后提醒大家注意，还可以采用不同厂家提供的 poly(A)$^+$ RNA 分离方法，包括基于磁性的分离产品和柱子离心分离的产品，这些产品都是针对 poly (A) 尾巴进行分离的。

7.5.1　实验方案[1]：用磁珠纯化 poly(A)$^+$ RNA

(1) 从总 RNA 分离 poly(A)$^+$ RNA

① 75μg 总 RNA 预计含有 1～4μg poly(A)$^+$ mRNA。将总 RNA 溶解于 100μl 不含

[1] 部分采用 Dynal 公司的资料 (Lake Success，NY)。

RNase 的水或 TE 缓冲液中。如果 RNA 样品的浓度低于 75μg/100μl，加入等体积的 2×结合缓冲液（1mol/L LiCl；20mmol/L Tris-Cl，pH7.5；2mmol/L EDTA）。

② 在 65℃加热 RNA 溶液 2min。

注意 破坏 RNA 的二级结构，使 poly(A) 尾巴更容易与基质的碱基进行配对，可以改进杂交的效果。

③ 当样品加热变性时，从重悬的储备液❶中取出 1mg Dynabeads oligo(dT)$_{25}$（通常 200μl）并转移到不含有 RNase 的微型离心管中。将离心管置于磁铁架。30s 后，在离心管依然置于磁铁架时用微型移液管彻底除去上清液。

④ 将 100μl 2×结合缓冲液加入到含有磁珠的微型离心管中。同样，在离心管置于磁铁架时彻底除去上清液。

⑤ 从磁铁架取出离心管，放在微型离心管架上。将 100μl 2×结合缓冲液加入到磁珠中，轻轻弹动将磁珠重悬。如果 RNA 样品在第①步开始时已经在结合缓冲液中稀释，这一步就不必加结合缓冲液。

⑥ 将热变性 RNA 加入磁珠悬浮液中，温和混合。在室温下杂交 5min。然后进行 mRNA 回收。

（2）直接从培养细胞分离 poly(A)$^+$RNA

① 按常规收集细胞（10^6～10^7 就足够了）。用冰冷的磷酸盐缓冲液（137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，4.3mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$，1.4mmol/L KH_2PO_4）洗涤。将细胞转移到微型离心管中，温和离心（200×g）沉淀细胞。

② 将沉淀细胞重悬于 100μl 裂解缓冲液（10mmol/L Tris-Cl，pH 7.5；0.14mol/L NaCl；5mmol/L KCl；1% TritonX-100 或 NP-40）中，在冰上放置 1min。如果需要，可以将 RNase 抑制剂加入裂解缓冲液中。

注意 也可以用其他常用的 RNA 裂解缓冲液代替。例如从固体组织中分离 poly(A)$^+$时采用其他缓冲液。

③ 离心样品 30s。

④ 将上清液转移到微型离心管中，置于冰上。

⑤ 从重悬的储存液中吸取适当体积的 Dynabeads oligo(dT)，转移到无 RNase 的微型离心管中。每 10^6 个细胞取 400μg 磁珠。然后将离心管置于磁铁架上。30s 后，用微型吸液器将离心管中的上清液彻底除去。

⑥ 将 100μl 2×结合缓冲液加入含有磁珠的离心管中。在离心管置于磁铁架上的情况下再一次将离心管里的上清液彻底除去。

⑦ 从磁铁架上取出离心管，用 100μl 2×结合缓冲液（20mmol/L Tris-Cl，pH 7.5；1mol/L LiCl；2mmol/L EDTA；0.4%～1%十二烷基硫酸钠）重新悬浮磁珠。接着，将这些重悬的磁珠转移到含有细胞裂解液的离心管中（来源于第④步操作）。

⑧ 温和混合，在室温下杂交 5min。然后进行 mRNA 回收。

（3）直接从固体组织中分离 poly(A)$^+$RNA

本方法有利于直接从组织分离 poly(A)$^+$RNA。利用这个方法已成功地从各种动植物组

❶ 倒置和弹动使离心管内 Dynabeads 储存溶液充分悬浮。不要来回吸取或涡旋，因为这些操作会导致 oligo(dT) 从磁珠上脱落，严重降低磁珠的效用。

织分离 poly(A)$^+$RNA。

① 碾磨已经在液氮中冷冻的组织（0.1g）。

② 将冷冻的粉末转移到含有 1ml 裂解/结合缓冲液（100mmol/L Tris-Cl，pH 8；500mmol/L LiCl；10mmol/L EDTA，pH 8；1%LiDS 或 SDS；5mmol/L 二巯基苏糖醇）的匀浆器中。

③ 彻底匀浆样品，当心不要产生过多热量或起泡。

当心　如果使用电动机驱动的匀浆器，必须采取厂家推荐的所有安全措施。

④ 将裂解物离心 30s。将上清液转移到微型离心管中，然后准备 Dynabeads。

⑤ 从重悬储存液中吸取 1.5mg Dynabeads oligo(dT)$_{25}$，通常是 300μl，加入无 RNase 的离心管中。将离心管置于磁铁架上，放置 30s。然后用微型吸液器彻底除去离心管中的上清液。

⑥ 将 150μl 裂解/结合缓冲液（100mmol/L Tris-Cl，pH 8；500mmol/L LiCl；10mmol/L EDTA，pH 8；1%LiDS 或 SDS；5mmol/L 二巯基苏糖醇）加入含有磁珠的离心管中。在离心管置于磁铁架时再一次用微型吸液器彻底除去离心管中的上清液。

⑦ 从磁铁架取出离心管，置于离心管架上。用 150μl 裂解/结合缓冲液重悬磁珠，然后将磁珠转移到第④步所获的含有组织匀浆上清液的离心管中。

⑧ 温和混合，于室温杂交 5min。然后进行 mRNA 回收操作。

（4）mRNA 回收

① 将含有 Dynabeads 和 RNA 的离心管置于磁铁架 30s 以上，吸出所有的上清液并转移到新离心管中，让这些上清液和 Dynabeads 重新杂交，以确保最大量地回收 poly(A)$^+$mRNA。如果没有必要用 Dynabeads 重新杂交，就可以将上清液简单标记为 poly(A)$^-$RNA 保存，用作阴性对照。

② 将离心管从磁铁架取出。用 200μl 洗涤缓冲液（0.15mol/L LiCl；10mmol/L Tris-Cl，pH7.5；1mmol/L EDTA）洗涤磁珠。再将离心管放入磁铁架，吸去所有的洗涤缓冲液。重复洗涤-去上清液操作。

注意　必须彻底吸去所有的上清液，尤其是在操作体积很小的时候，这样才能最大限度回收富集的 poly(A)$^+$RNA。

③ 从磁铁架取出离心管，将所需量的洗脱缓冲液［TE 缓冲液（pH 7.5）或无菌水］加入结合有 poly(A)$^+$RNA 的 Dynabeads 中。根据开始使用 Dynabeads 的剂量确定洗脱缓冲液体积，每 1mg Dynabeads 可能至少需 5μl 的洗脱缓冲液。65℃加热 2min 有利于 poly(A)$^+$RNA 与 Dynabeads 快速而彻底地分离。迅速将离心管置于磁铁架，30s 后，将上清液转移到另一个微型离心管中并将该离心管标记为 poly(A)$^+$RNA。

④ 洗脱的 RNA 可以马上使用，也可以分装成合适体积保存于－80℃备用。有些研究人员喜欢将 RNase 抑制剂加入 RNA 溶液中。但是对于除 RNase 操作出色的研究人员而言，添加 RNase 抑制剂是不需要的。

7.6　oligo(dT)-纤维素柱层析

对本技术早先改进的方式之一是将 oligo(dT)-纤维素填入 1ml 结核菌素注射器。洗出液直接流过紫外（UV）吸收检测器，如 ISCO UA-6（ISCO，Inc.，Lincoln，NE），该装

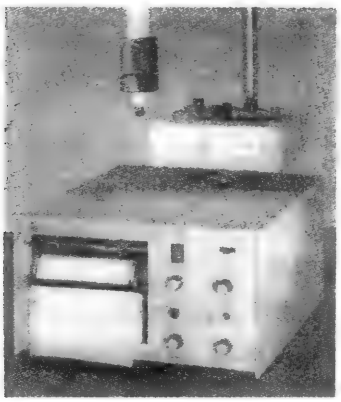


图 7.3　UA-6 紫外吸收检测器。ISCO，Inc. 提供

置普遍用于蛋白质层析（图 7.3）。随着 RNA 从柱子中流出并经过光学检测元件（图 7.4），UV 光吸收和流出液的 RNA 浓度被检测仪的记录笔记下。虽然这种方法比这里介绍的其他方法费时，但是本方法可以很直接观察到 poly(A)$^+$ RNA 和 poly(A)$^-$ RNA 吸收谱的大小。除了峰值大小外，洗脱图谱（图 7.5）的形状是 RNA 质量和完整性及纤维素柱层析洗脱效率的重要指标之一。但是，本技术有两个主要缺点：①即使流速缓慢，从柱子洗脱出来的 RNA 溶液体积还是比较大，不利于后续的 RNA 浓缩❶；②不能检测光密度（OD）低于 0.1 的核酸溶液，因此本技术不适于总 RNA 低于 100～150μg 的样品。

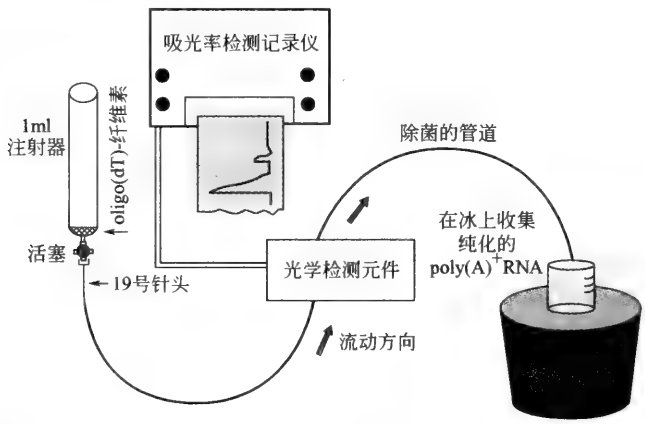


图 7.4　纯化大量 poly(A)$^+$ RNA 的方法。oligo(dT)-纤维素装入 1ml 注射器中，流速由柱子下面的活塞控制。活塞经高温消毒除去了 RNase。活塞下的针头与管子结合，将洗出液引入紫外（UV）检测器。紫外检测器能测定核酸溶液在 254nm 波长的吸收值。装在检测器上的记录笔偏离的幅度记录流过紫外检测器的核酸溶液浓度，每个样品结合和洗脱的情况记录在图表纸上，即层析图谱。用一系列试管收集流出检测器的洗脱液。通常将收集管置于冰冻桶中。研究人员可以根据图表记录器的记录笔移动确定收集洗脱液的准确时间

7.6.1　实验方案：生理量的 poly(A)$^+$ RNA 纯化

① **戴手套！**

② 根据厂家的说明书准备 oligo(dT)-纤维素。典型的操作是，用 3～5ml 洗脱缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.4；0.05% SDS❷）或 DEPC 处理的水悬浮 10mg oligo(dT)-纤维素。

注意　1g oligo(dT)-纤维素可以结合 20～50 OD 的 poly(A)$^+$ RNA，具体的结合量取决于 oligo(dT)-

❶ 如果 RNA 浓度低于可沉淀水平，就必须加入载体 RNA 协助沉淀。但是这样操作首先与 mRNA 纯化的总目标相抵触。把核酸样品维持在高浓度状态是明显的优势。

❷ 在有些情况下，将 SDS 加入洗脱缓冲液和结合缓冲液可能是不合适的，因为 SDS 可能会沉淀，从而堵塞层析柱（尤其是在有空调的实验室！）。此外，残留的 SDS 会使后续操作的酶失活。除 RNase 操作出色就不需要添加 SDS。

纤维素精化的程度。假定总 RNA 样品有 5%是多聚腺苷酸化的，则用比多聚腺苷酸化 RNA 量多 3～5 倍的 oligo(dT)-纤维素结合 poly(A)$^+$ RNA。维持这样的参数是很明智的，因为 oligo(dT)-纤维素体积过大可能会改变 RNA 洗脱的特点，而且会加大实验成本［现在每克 oligo(dT)-纤维素的售价是 150 美元］。oligo(dT)-纤维素是不溶的，不要剧烈搅拌，也不要振荡；而应该温和地弹动或翻转 oligo(dT)-纤维素管，使 oligo(dT)-纤维素重新悬浮。如果起始的总 RNA 量大（如 10mg RNA）可以使用含有 1ml oligo(dT)-纤维素的大孔径层析柱。

③ 用消过毒的聚酯碎末填入 1ml 结核菌素注射器的底部。注意只需要用最少量的聚酯碎末置于注射器筒的底部阻止 oligo(dT)-纤维素的流失。要避免聚酯碎末堵塞注射器的颈部。也可改为将聚酯碎末向下推到近针筒底部即止。

注意　大多数嗜好品商店都有聚酯碎末出售。与玻璃纤维相比，聚酯碎末易操作。能用高温消毒聚酯碎末（15min）。操作时要戴手套。

④ 用 9in[1] 的无核糖核酸酶的巴斯德吸液管将 oligo(dT)-纤维素上样到注射器。让 oligo(dT)-纤维素自动沉淀于聚酯碎末的顶部。oligo(dT)-纤维素和聚酯碎末的总体积不要超过 0.1ml。

⑤ 当 oligo(dT)-纤维素沉淀之后，用 2～3ml 的结合缓冲液（500mmol/L NaCl；10mmol/L Tris，pH7.4；0.05% SDS）平衡层析柱，保证压紧 oligo(dT)-纤维素柱。

⑥ 将注射器底部装上无菌的活塞，用该活塞调控液体流过层析柱的速度。重新用结合缓冲液淋洗层析柱，保证聚酯碎末或聚酯碎末上面的 oligo(dT)-纤维素没有气泡。

注意　聚丙烯树脂活塞能高温消毒和重新使用，因此这种活塞很有用。在装层析柱时，最好将活塞置于注射器底部并将活塞调至开放状态，这样就不会干扰 oligo(dT)-纤维素。

⑦ 小心地将无菌的 19 号针头或钝针头装在活塞底部。用结合缓冲液淋洗层析柱，保证塞子中或塞子上面没有气泡存在。

⑧ 层析柱的流出管与紫外检测器［如 ISCO UA-6(ISCO，Inc.，Lincoln，NE)］相连。该检测器有 254nm 或 280nm 的滤光片。连接管无 RNase，适合 19 号针头和紫外检测器流入口。样品从样品池底部流入，顶部流出。采用这种方式，系统的流速仅取决于流体静态压力。

注意　此时一定要保证层析柱没有流干。将流速调节至每分钟 2ml。poly(A) 尾巴和纤维素的 oligo(dT)-碱基配对需要相对慢的液体流速。反复开关活塞是不可取的，因为反复开关活塞会扰动 oligo(dT)-纤维素。流出的 oligo(dT)-纤维素会阻塞检测器的样品池，导致有用材料的流失。不管采用什么层析方法，柱子流速均匀才能达到理想的分离效果。

⑨ 连续用结合缓冲液淋洗层析柱，直到流出液成为检测基线。在作者实验室，通常将灵敏度设为 0.1 OD。检测含量只有 10～200μg 多聚腺苷酸化 RNA 的层析柱流出液，灵敏度必须设置在这个水平。检测所需的灵敏度由样品的 RNA 含量决定。

注意　建议将记录笔的基线设置在记录纸的 10%处，因为结合和洗脱缓冲液折射系数的差异会造成基线的波动。

⑩ 将 RNA 溶于 500～1000μl 结合缓冲液中。将 RNA 溶液加到层析柱上［每克 oligo(dT)-纤维素上样量达 50mg RNA］。在层析柱缓冲液的弯月面降至层析柱的 oligo(dT)-纤维素基面时，即层析柱内缓冲液几近流干时，将 RNA 溶液吸入无菌的巴斯德移液管，并将

[1] 1in=0.0254m。

RNA 溶液仔细地加到 oligo(dT)-纤维素基面。让液体流出使 RNA 溶液进入层析柱床。然后用大量的结合缓冲液淋洗层析柱。千万不能让层析柱里的缓冲液流干。

建议 将样品在 65℃加热 5min 后，马上在冰上快速冷却。然后将 RNA 溶液加到层析柱上。加热处理能够破坏 RNA 的二级结构，有助于 RNA 的 poly(A) 尾巴与纤维素的 oligo(dT) 配对。如果有 RNA 二级结构存在，poly(A) 尾巴可能无法与 oligo(dT)-纤维素结合。

⑪ 随着非 poly(A)RNA 流出层析柱，检测器的记录笔会发生巨大偏移 [图 7.5(a)]。继续用结合缓冲液淋洗层析柱。

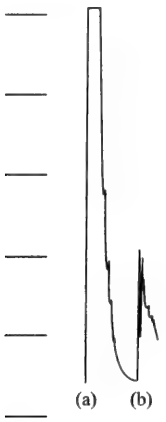


图 7.5 与 oligo(dT)-纤维素 poly(A)$^+$ RNA 结合和洗脱图谱。洗脱液直接通过 ISCO UA-6(UV) 检测器。灵敏度设置成 0.1 OD，这个灵敏度是检测低于 100μg poly(A)$^+$ mRNA 的洗脱液所必需的。(a) 将溶于结合缓冲液（高盐）的细胞质总 RNA(150μg) 上样，用结合缓冲液连续冲洗柱子，直到流出液的检测数据回到基线，表明已经洗去所有的非 poly(A)RNA。(b) 用洗脱缓冲液（低盐）洗脱 poly(A)$^+$ RNA。降解的 RNA 产生的洗脱峰较宽，不能产生明显的峰形

建议 收集流出液并将流出液再一次加到层析柱上，可以最大限度地捕获 poly(A)$^+$ RNA。由于有些 poly(A)$^+$ RNA 在第一次过柱时会流出 oligo(dT)-纤维素柱，这样操作可能有利。

⑫ 继续用结合缓冲液淋洗层析柱，直至检测器记录笔的位置重新回到基线。如果需要回收 poly(A)$^-$ RNA，应当把含有 poly(A)$^-$ RNA 流出液收集到冰上冷冻的试管中。

注意 1 可以将 poly(A)$^-$ RNA 重新沉淀，用作 RNA 分子量标准或者 Northern 分析、核酸酶保护分析以及 PCR 类分析的阴性对照。

注意 2 当上样到层析柱的 RNA 溶液含有前面进行 RNA 沉淀所带入的大量盐和/或基因组 DNA 时，层析柱流速会显著降低。流速显著降低表明层析柱堵塞，必须消除堵塞。流速降低也可能是层析柱内的气泡造成的。在活塞置于开放状态时赶出气泡或残渣，然后重新调节流速，就能解决这些问题。在更多极端的例子中，疏通层析柱，可能要打散 oligo(dT)-纤维素床。与普通凝胶过滤不同，亲和层析不受层析柱形状影响。因此打散 oligo(dT)-纤维素床通常不会降低柱层析的分辨率。一旦 oligo(dT)-纤维素颗粒沉淀回到原来的位置，就可继续层析。只有用洗脱缓冲液除去电荷相反的离子，才能将 poly(A)$^+$ RNA 从 oligo(dT)-纤维素中洗脱出来。

⑬ 将第②步制备的洗脱缓冲液预热到 45℃，洗脱层析柱回收 poly(A)$^+$ RNA。应该将 poly(A)$^+$ RNA 洗脱液回收到置于冰桶的 Corex 玻璃离心管或其他合适的试管中。这些离心管或试管没有 RNase 活性。

注意 预热洗脱缓冲液能大大促进用最小体积的洗脱缓冲液快速洗脱 poly(A)$^+$ RNA；人们喜欢将核酸溶液尽量制备成高浓度。

⑭ 用 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）和 2.5 倍体积 95%的冷乙醇，于－20℃重新沉淀 RNA。每 10^7 个细胞可以回收 1～5μg poly(A)$^+$ mRNA。

注意 如果产出低或洗脱的 RNA 溶液浓度低，加入糖原可能有助于 RNA 的重新沉淀。每毫升 poly(A)$^+$ RNA 洗脱液加入 10μl 的 10mg/ml 糖原溶液，然后加入 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）和

2.5 倍体积 95%的冷乙醇，在－20℃放置 4h 以上。

⑮ 用 2～3ml 0.1mol/L NaOH 洗涤 oligo(dT)-纤维素柱，然后用结合缓冲液重新平衡、再生 oligo(dT)-纤维素。Parafilm 封口膜密封的柱子可以在 4℃保存于 100～200μl 缓冲液中。记住在室温下保存会使细菌在纤维素中生长。

7.7　快速非柱式纯化 poly(A)$^+$RNA

不用传统的柱层析也能分离 poly(A)$^+$RNA。事实上，必须与亲和柱层析不同才能完成相对量少的起始 RNA（典型的是少于 200μg 总 RNA）的分离。除了柱制备和柱层析的工作量大之外，柱层析最主要的缺点是柱层析难免会造成 RNA 稀释，加之 poly(A)$^+$RNA 占总 RNA 的比例非常少。如果产量极少或 RNA 溶液太稀，不加载体分子（如 tRNA 或糖原）则不可能沉淀纯化的 RNA。但添加载体的策略与纯化 poly(A)$^+$RNA 的初衷相违背，而且过量的糖原与一些后续的 RNA 应用相抵触。

另一种能够进行 poly(A)$^+$RNA 纯化的基质是 oligo(dT)-微晶纤维素（Monomer Sciences，Inc.，New Market，AL）。每克 oligo(dT)-微晶纤维素通常能结合 100 OD（A_{260}单位）以上的 poly(A)$^+$RNA。而标准条件下每克 oligo(dT)-纤维素典型的结合能力在 50～80 OD。oligo(dT)-纤维素的实际结合能力取决于生产厂商、产品级别和结合缓冲液的单价阳离子特征。单价阳离子是 Li^+时，oligo(dT)-纤维素结合 poly(A)$^+$RNA 的容量比结合缓冲液的单价阳离子是 K^+或 Na^+的大。用传统的高盐离子缓冲液悬浮 oligo(dT)-纤维素，然后离心收集 oligo(dT)-纤维素。如此反复操作，分离 poly(A)$^+$RNA 的效果最好。这样能避免柱层析经常发生的流速过慢现象。应该注意，建议不用 oligo(dT)-微晶纤维素进行柱层析，除非是厂家用 oligo(dT)-微晶纤维素预先充填的层析柱。如果按比例减小，可以在微型离心管中完成 poly(A)$^+$RNA 的分离。因此，能用很小体积的洗脱缓冲液洗脱 poly(A)$^+$RNA，所获得的 RNA 溶液不必添加额外的载体就能直接用盐和乙醇沉淀洗脱的 RNA 分子。

作者对一种 oligo(dT)-微晶纤维素分离 RNA 方法进行了修改，下面介绍这个修改后的方法。虽然标准的 oligo(dT)-纤维素层析也采用类似的方法，但是 oligo(dT)-纤维素（微晶级）层析回收 poly(A)$^+$RNA 容量最大。注意，在所有操作中必须严格控制 RNase 活性，高质高量地回收 poly(A)$^+$RNA。

7.7.1　实验方案：快速非柱式纯化 poly(A)$^+$RNA

① 戴手套！

② 称取适量的 oligo(dT)-微晶纤维素。每 150μg 总 RNA 需要 100mg（干重）的 oligo(dT)-微晶纤维素。将 oligo(dT)-微晶纤维素置于无核酸酶污染的微型离心管中。

注意　必须在无 RNase 的条件下称量 oligo(dT)-微晶纤维素。虽然高压灭菌或烘干的钢锹没有 RNase 活性，但是温和地敲动试剂瓶底部，让 oligo(dT)-微晶纤维素从试剂瓶内移出进行称量要好得多。

③ 将 500μl 结合缓冲液（500mmol/L LiCl；100mmol/L Tris-Cl，pH 7.5；1mmol/L EDTA；最好还有 0.05% SDS）加入 oligo(dT)-微晶纤维素中，平衡纤维素 5min。

④ 离心已经平衡的 oligo(dT)-微晶纤维素。离心条件是 200×g，30s 内完成。在不干扰 oligo(dT)-微晶纤维素沉淀的情况下，仔细地除去上清液。将处理好的微晶纤维素放置备用。

⑤ 在另一个离心管中，DEPC 处理的水溶解 RNA，终体积 100μl。在 65℃加热 5min。

注意 在本实验方法和其他相关的实验方法中，RNA 溶液必须加热变性，使 poly(A) 结构能更有效地与纤维素的 oligo(dT)-碱基配对。

⑥ 将等体积的结合缓冲液加入热变性 RNA 溶液中，使 RNA 溶液降至室温。将 RNA 溶液加入第④步制备的 oligo(dT)-微晶纤维素中。

⑦ 将离心管置于微型离心管架上，在室温下放置 5min。在此期间，用手温和地摇动离心管 1～2 次。

⑧ 1500×g 离心 5min（如果可能，在 4℃离心）。仔细地将上清液转移到一个干净的离心管中，标上“poly(A)$^-$RNA。”将该离心管置于冰上。

注意 1 如果结合缓冲液含有 SDS，最好在室温下离心。离心温度不得低于 15℃，否则会发生 SDS 沉淀。

注意 2 在各种实验中用 poly(A)$^-$RNA 作为阴性对照是很有用的。poly(A)$^-$RNA 也可以作为载体 RNA。

⑨ 用结合缓冲液洗涤 oligo(dT)-微晶纤维素 5 次，每次 500μl。每次洗涤后，在 1500×g 离心，除去上清液。

⑩ 用洗脱缓冲液（10mmol/L Tris-Cl，pH7.5；1mmol/L EDTA；0.05% SDS）从 oligo(dT)-微晶纤维素洗出 poly(A)$^+$RNA，一至几次，每次 50μl。也可以用 DEPC 处理的水洗脱 poly(A)$^+$RNA。

注意 所需洗脱缓冲液洗脱次数取决于纤维素所结合的 poly(A)$^+$RNA 量和每次洗脱所用的缓冲液体积。第一次洗脱溶液含有大多数 poly(A)$^+$RNA。逻辑上说，根据经验用较小体积的缓冲液洗脱 poly(A)$^+$RNA 很有用。应该在一个或多个微型离心管中重新沉淀 RNA。加入 0.1 倍体积 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 2.5 倍体积 95%冷乙醇，然后将 RNA 溶液置于干冰 20min 或－20℃ 4h 以上重新沉淀 RNA。

⑪ 在 RNA 沉淀和离心后，仔细地倒出乙醇上清液。用 70%乙醇（用无菌水配制）洗涤 RNA 沉淀 2～3 次，每次 500μl。最后用 95%乙醇洗涤可能有利于 RNA 沉淀在空气中干燥。用最小体积的 TE 缓冲液（pH 7.5）或无菌水重悬 RNA。

⑫ 按照第 8 章介绍的方法测定 poly(A)$^+$ RNA 溶液的 A_{260}。

⑬ 将 RNA 溶液分装，保存于－80℃备用。

7.8 参考文献

Aviv, H., and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69,** 1408.

Aziz, N., and Munro, H. N. (1986). Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction. *Nucleic Acids Res.* **14,** 915.

Buell, G. N., Wickens, M. P., Payvar, F., and Schimke, R. T. (1978). Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J. Biol. Chem.* **253,** 2471.

Cole, C. N., and Stacy, T. P. (1985). Identification of sequences in the herpes simplex virus thymidine kinase gene required for efficient processing and polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **5,** 2104.

Conway, L., and Wickens, M. (1985). A sequence downstream of A-A-U-A-A-A is required for formation of simian virus 40 late mRNA 3′ termini in frog oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82,** 3949.

Darnell, J. E., Jr. (1979). Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses. *Prog. Nucleic Acids Res.* **22,** 327.

Efstratiadis, A., Kafayos, F. C., Maxam, A. M., and Maniatis, T. (1976). Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. *Cell* **7,** 279.

Gil, A., and Proudfoot, N. J. (1984). A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit beta-globin mRNA 3′-end formation. *Nature* **312,** 473.

Gilham, P. T. (1964). Synthesis of polynucleotide celluloses and their use in fractionation of polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **86,** 4982.

Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* **65,** 367.

Manley, J. L. (1988). Polyadenylation of mRNA precursors. *Biochem. Biophys. Acta* **950,** 1.

McDevitt, M. A., Imperiale, M. J., Ali, H., and Nevins, J. R. (1984). Requirement for a downstream sequence for generation of a poly(A) addition site. *Cell* **37,** 993.

Mercer, J. F. B., and Naora, H. (1975). A comparison of the chromatographic properties of various polyadenylate binding materials. *J. Chromatogr.* **114,** 115.

Meyuhas, O., Bibrerman, Y., Pierandrei-Amaldi, P., and Amaldi, F. (1996). Isolation and analysis of polysomal RNA. *In* "A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis" (P. A. Krieg, Ed.), pp 65–81. Wiley Liss, New York.

Meyuhas, O., Thompson, A. E., and Perry, R. P. (1987). Glucocorticoids selectively inhibit the translation of ribosomal protein mRNAs in P1798 lymphosarcoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 2691.

Moore, C. L., and Sharp, P. A. (1985). Accurate cleavage and polyadenylation of exogenous RNA substrate. *Cell* **41,** 845.

Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: poly(A)$^+$ nuclear sequences are conserved and polyadenylation precedes splicing. *Cell* **15,** 1477.

Pierandrei-Amaldi, P., and Amaldi, F. (1994). Aspects of regulation of ribosomal protein synthesis in *Xenopus laevis*. *Genetica* **94,** 181.

Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976). 3′ non-coding region sequences in eukaryotic mRNA. *Nature* **263,** 211.

Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* **59,** 423.

Sadofsky, M., and Alwine, J. C. (1984). Sequences on the 3′ side of hexanucleotide AAUAAA affect efficiency of cleavage at the polyadenylation site. *Mol. Cell Biol.* **4,** 1460.

Takagaki, Y., Ryner, L., and Manley, J. L. (1988). Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell* **52,** 731.

Williams, J. G. (1981). The preparation and screening of a cDNA clone bank. *In* "Genetic Engineering." (R. Williamson, Ed.), pp 1–59, Vol. 1. Academic Press, New York.

Ziff, E. B. (1980). Transcription and RNA processing in the DNA tumor viruses. *Nature* **287,** 491.

（刘建华　郑艳译；金由辛校）

第8章　RNA制备的质量控制

8.1　基本原理

用纯化的RNA样品进行后续研究必须评价其质量。尤其重要的是，要肯定mRNA组分的完整性。由于纯化RNA的后续应用费用高、工作量大，因此在确定mRNA完整性时要特别慎重。这样才能使后续的RNA应用试验能产生最好的结果。如同人们不能用腐烂的木头建造房子那样，研究人员也不能用含量无法检测的或者降解了的RNA进行后续研究。

有多种方法检测纯化RNA的完整性和RNA的总体质量。有些检测方法，可以用作RNA后续应用的阳性对照。在下面所要介绍的方法中，RNA纯化后要立即检测其电泳图谱(质量控制技术1)。而且，如果已经将RNA保存了一段时间，使用前要重新检测RNA的电泳图谱。用试剂盒纯化的或者已经保存几个月（即使在－80℃保存）的RNA，即使以前电泳鉴定合格的RNA，其质量也不一定有保障。

8.2　质量控制技术1：RNA的电泳检测

总的来说，RNA琼脂糖凝胶电泳是判断RNA质量最好的检测方法。附录13和第10章分别介绍了电泳的参数和操作方法。有生物活性的整分子RNA，变性后的电泳条带独特。RNA变性容易，只需在上样前将RNA样品简单加热。

28S核糖体RNA(rRNA)和18S rRNA的荧光比值，是判断RNA样品可用性的最好指标。对哺乳动物RNA而言，该荧光比值至少是2∶1。如果荧光比值达到甚至超过2.5∶1就更好。根据作者个人和其他研究人员的经验，28S rRNA和18S rRNA的荧光比值越小，样品的代表性就越差，实验结果的可重现性就越低。可以仅用“目测”的方法估计28S rRNA和18S rRNA凝胶条带的荧光比值，但如果需要，用成像分析软件确定28S rRNA和18S rRNA的荧光比值。对高等真核生物而言，28S rRNA和18S rRNA的荧光比值越大越好。但要记住电泳图谱其他特征也很重要。

最好的RNA(eRNA)样品，其电泳图谱的28S rRNA和18S rRNA条带之间、条带上方和条带下方几乎没有弥散。电泳时转移RNA(tRNA)和低分子量的5S rRNA和5.8S rRNA处于凝胶的前端。在染色后这些小分子RNA条带处于溴酚蓝附近，其位置与溴酚蓝很难分开。如果28S rRNA和18S rRNA的电泳条带不清晰，说明RNA样品有核酸酶污染，尤其是凝胶的下半部，即分子量低于18S rRNA的区域，出现条带弥散现象。如果整块凝胶上都有严重的弥散现象，说明RNA样品已经发生有限的降解。但是，凝胶电泳条带严重弥散也可能

是上样前 RNA 变性不充分，还有就是 RNA 二级结构的存在。而且，作者还注意到没有完全溶解的 RNA 电泳时，会出现第 6 章描述的特征性拖尾现象。虽然前面说过，核酸储存液浓度越高越好，但必须确定 RNA 或 DNA 已经被彻底溶解。只有这样，每次从核酸储存液取出的适量液体才有代表性。含有去污剂和过量盐的核酸样品，电泳时也会出现 RNA 条带弥散。有时候这些组分会阻止 RNA 分子进入凝胶。如果经常出现这种现象，用 *N*-十二烷基肌氨酸钠（sarkosyl）可以缓解变性剂造成的问题。如果操作不仔细没有除去 DNA[1]，后者将与 RNA 共沉淀（如第 5 章和附录 5 所描述的），这些污染 DNA 将对后续的 RNA 应用产生严重影响。

Northern 分析最好添加甲醛和甲酰胺。甲醛和甲酰胺使在非变性条件下电泳的核糖体 RNA 条带非常明显。必须注意，添加 50％甲酰胺或 2mol/L 尿素有利于样品变性，使凝胶电泳图谱清晰可辨。而没有添加变性剂的凝胶电泳图谱模糊难辨。肉眼观测含量丰富的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带，可以确定 RNA 样品的完整性（图 8.1）。

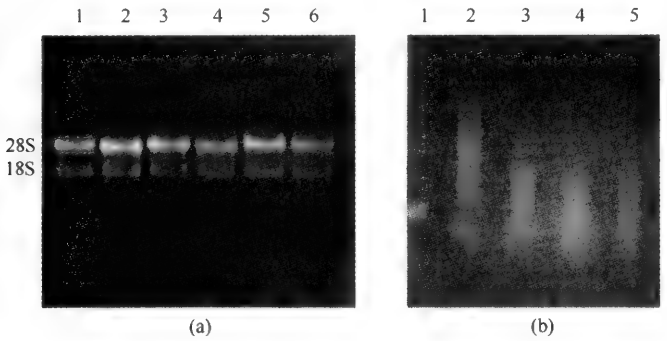


图 8.1　RNA 样品完整性检测。(a) 从 Swiss 鼠 3T3 成纤维细胞分离的 RNA，在微型琼脂糖凝胶（7cm×8cm）电泳的图谱。每个样品槽上样 5μg 纯化 RNA，凝胶是 1.2％琼脂糖-甲醛凝胶，电泳条件是电压 50V，电泳 1.5h。电泳后用 SYBR 绿Ⅱ染色凝胶。在泳道 1～6，28S 和 18S 的核糖体 RNA(rRNA) 条带清晰，28S rRNA 荧光强说明 RNA 样品是完整的。(b) 人成纤维细胞 RNA，在微型琼脂糖凝胶（6cm×9cm）电泳的图谱。泳道 1 是 RNA 分子量标准，泳道 2～5 是四份来源不同的人成纤维细胞 RNA 样品。凝胶是 1.2％琼脂糖-甲醛凝胶。电泳条件是电压 50V，电泳 1.5h。电泳后用溴化乙锭染色凝胶。泳道 2～5 显示样品的降解程度逐步加大，最可能是分离 RNA 时有 RNase 污染。这是应该避免的

用溴化乙锭或 SYBR 绿染色时，RNA 凝胶电泳图谱上，加样孔内和紧挨着的下方，出现的荧光是污染的基因组 DNA（图 8.2）。出现这种现象时，明智的做法是在定量分析 RNA 样品前，确定这种现象是否因 DNA 含量过高引起的。当然，没有出现高分子量荧光条带，并不意味着 RNA 样品没有 DNA 污染，有可能是 DNA 的含量低于检测水平。由于污染 DNA 也可以作为模板，因此污染 DNA 对大多数基于 RNA 的聚合酶链反应有严重的负面影响。唯一可靠的消除 RNA 样品中污染 DNA 的方法，是用不含 RNase 的 DNase 处理样品。同时要有相应的对照证明 DNA 被彻底除去，例如第 19 章介绍的不加反转录酶的聚

[1] 从 RNA 样品除去 DNA 的方法包括完整细胞核差异离心，用不含 RNase 的 DNase Ⅰ处理核酸样品，用酸 醇反复抽提，RNA 的等密度离心，或者将以上方法结合使用。

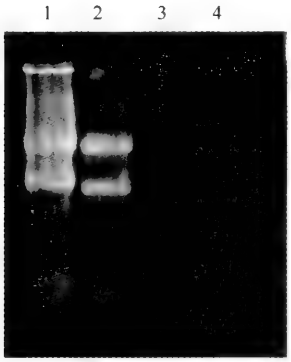


图 8.2 RNA 样品用 SYBR 绿Ⅱ染色。上样槽有强烈荧光提示 RNA 样品有基因组 DNA 污染

合酶链反应，除非有 DNA 存在，否则不会产生 PCR 条带。

8.2.1 实验方案

用标准的、非变性的 1.2%琼脂糖凝胶（胶面积：7cm×8cm）电泳可以确定 RNA 的完整性。电泳前加热变性 RNA，迅速加样电泳以消除二级结构的影响。

① 琼脂糖悬浮于 1×TAE 缓冲液❶，融化制成 1.2%浓度的琼脂糖凝胶。当凝胶冷却到 65℃时倒胶。

注意 如果需要，可以将溴化乙锭直接加入融化的凝胶至终浓度为 0.5μg/ml。这样，电泳结束后能直接检测凝胶。SYBR 绿在电泳前不可以加入凝胶，否则 SYBR 绿会造成核酸条带宽，不清晰。只有在电泳结束后才用 SYBR 绿染色凝胶。

② 在凝胶凝固的过程中，用 10μl 无菌水或 TE 缓冲液稀释 1～5μg RNA。

注意 如果加热难以使 RNA 变性，那么每 10μl RNA 溶液加入 2.5μl 甲醛（37%储备缓冲液）和 5.0μl 甲酰胺。使用甲醛和甲酰胺时，要根据厂商提供的安全资料（MSDS）在通风橱中小心操作。此外，也可以将甲酰胺或 2mol/L 尿素单独加入 RNA 样品中。

③ 在 65℃加热 RNA 溶液 5min，简单离心将样品甩到离心管底部。

④ 加入 1μl 10×上样缓冲液（50%甘油，1mmol/L EDTA，0.25% 溴酚蓝），然后加样到凝胶上。

注意 1 如果在 RNA 样品中加入了甲醛和甲酰胺，就用 2μl 上样缓冲液。

注意 2 不必使用分子量标准；本实验只是快速检测 RNA 分子是否完整。

⑤ 用 75～100V 电压电泳至染料在凝胶内泳动 2～3cm。要观测凝胶内样品分离的情况就得电泳这么长的时间。不过，电泳更长的时间能够提高凝胶的分辨率。

⑥ 除非将染料直接加入琼脂糖，否则就要用溴化乙锭（0.5μg/ml）水溶液染凝胶 10min。或者用 SYBR 绿Ⅱ染色凝胶 25～30min。照通常的做法检测 RNA 样品是否降解和有无 DNA 污染。

注意 1 溴化乙锭是突变剂，必须小心操作，适当处理（附录 4）。

注意 2 使用紫外线透射仪或便携紫外灯（UV）时，要保护眼睛和皮肤免受紫外线伤害。

⑦ 若检测 RNA 样品质量，用紫外可见光成像系统拍照存档（第 11 章）作为后续 RNA 使用的参考，这点极其重要。

8.3 质量控制技术 2：紫外吸收光谱和吸收峰比值

用吸收光谱确定样品的 RNA 含量，工作量最小。用 UV 吸收光谱能直接测定核酸的浓度和纯度，间接计算生物材料的核酸总量，甚至一个细胞的 RNA 总量（如果知道分离起始

❶ 每升 50×TAE 缓冲液含有 242g Tris 碱；100ml 0.5mol/L Na_2-EDTA，pH 8.0；57.1ml 冰醋酸。高压灭菌。融化琼脂糖用 1×TAE 缓冲液，电泳缓冲液也是 1×TAE。

时大致的细胞数量）。此外，纯化的核酸样品在 230～320nm 之间有特征性吸收谱（图 8.3）。偏离了标准曲线的形状，即峰位的偏离，表明样品有污染。由于实际投入的 RNA 量与大多数后续的 RNA 应用密切相关，因此绝对不能忽视 RNA 样品 UV 吸收光谱的重要性。

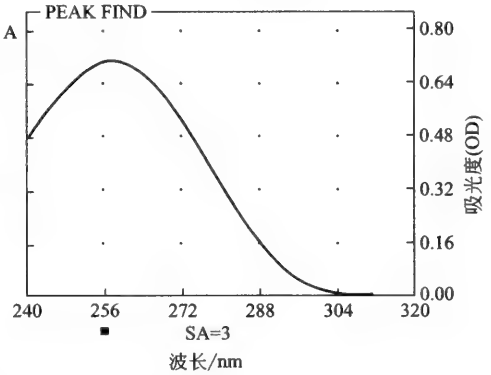


图 8.3　纯化 RNA 典型的紫外（UV）吸收光谱。纯化 DNA 的紫外吸收光谱与此类似。注意低于 260nm 的吸收谱是向上倾斜的曲线，而高于 260nm 的吸收谱是向下倾斜的曲线

8.3.1　核酸浓度和纯度的鉴定

核酸操作的成功率，严重依赖于反应中的核酸量和纯度。研究某一基因表达的上游或下游调节时，必须建立样品数据标准化的基础。首先要标准化加入 RNA 的量。然后，酶/引物/RNA 模板的比值要固定［该比值是 RNA 高效反转录成互补 DNA（cDNA）的关键］。因此，必须知道模板的精确浓度。纯化 RNA 或 DNA 样品时，记录至少要包括样品的浓度、纯度和完整性。

8.3.1.1　吸收光谱法

利用核酸吸收紫外线和 260nm 吸收值最大的特性，确定 DNA 和 RNA 样品的浓度和纯度。根据 260nm 波长的吸收值，直接计算样品的核酸浓度：

$$[\text{RNA}]\mu\text{g/ml}=A_{260}\times\text{稀释倍数}\times 40.0$$

式中　A_{260}——260nm 的吸收值（光密度）；

稀释倍数——稀释因子（通常是 200～500）；

40.0——RNA 的平均吸收系数。

同样，也可以用相似的方法确定 DNA 样品浓度：

$$[\text{DNA}]\mu\text{g/ml}=A_{260}\times\text{稀释倍数}\times 50.0$$

式中　A_{260}——260nm 的吸收值（光密度）；

稀释倍数——稀释因子（通常是 200～500）；

50.0——双链 DNA 的平均吸收系数。

必须注意，上述 RNA 和 DNA 浓度计算公式所得数据的单位是 μg/ml。对分子生物学家来说，浓度单位用 μg/μl 表示比较方便，进行样品稀释的数学计算简单。记住上述公式所得数据要除以 1000，就是浓度单位为 μg/μl 的数据。

为了更精确地确定核酸浓度，若已知分子的（G＋C）含量，就可以用 Beer 法则❶计算特定 RNA 或 DNA 的吸收系数。在大多数情况下，分子生物学将 40.0 和 50.0 分别作为 RNA 和 DNA 的平均吸收系数。由于胸腺嘧啶和尿嘧啶的吸收系数不同，DNA 污染了的 RNA 样品或 RNA 污染了的 DNA 样品，用紫外吸收光谱计算样品的浓度，就会偏高或偏低。用 40μg/ml RNase 于 37℃处理 DNA 样品 30min，然后重新沉淀 DNA，可以彻底除去

❶ 根据 Bouguer-Beer 法则（通常称为 Beer 法则），$A=\varepsilon bc$，A 是吸收值；ε 是摩尔吸收系数；b 是光径长度；c 是吸光物质的浓度，例如腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、胸腺嘧啶核苷和尿嘧啶核苷。该公式又可以表示为 $\varepsilon=\frac{A}{bc}$。因为 $A_{TOT}=A_1+A_2+A_3+\cdots$，可以计算出核酸混合物的吸收系数。例如，人类 RNA 吸收系数的精确值是 44.19。

DNA 样品中的 RNA。此外，如果污染了 RNA，DNA 分子的电泳迁移率通常会增加，这样会使 DNA 片段长度的估计偏低。同样，用没有 RNase 污染的 DNase 处理 RNA 样品，能够彻底除去 RNA 样品中污染的 DNA 分子。

最好将核酸样品按照（1∶200）～（1∶500）稀释，然后用酸洗过的石英比色皿❶测定核酸溶液的紫外吸收。现在厂商提供新一代一次性使用的塑料比色皿，可以用这种比色皿测定核酸样品的紫外吸收。由于有些塑料比色皿不是紫外级的，因此定购前要仔细阅读塑料比色皿的产品介绍。

许多更新的分光光度计有能够测量少至 1μl 样品的比色皿。尽管大家都喜欢，但这样的设备非常昂贵，超出了经费并不宽裕实验室的支配能力。如果需要，用 1～5mmol/L 磷酸缓冲液（Na_2HPO_4）或 TE 缓冲液稀释核酸样品（不要用水稀释），并用相同的缓冲液将分光光度计调零。

过去几年有人对 A_{260}/A_{280} 的比值作为核酸纯度指标提出质疑（Glasel，1995；Huberman，1995；Manchester，1995；Manchester，1996）。Wilfinger 等（1997）证实稀释剂的 pH 会影响核酸 A_{260}/A_{280} 的比值，pH 在 7.5～8.5 之间用 A_{260}/A_{280} 的比值检测核酸纯度最可靠。现在大家常用缓冲液（如磷酸）将 DNA 和 RNA 样品稀释，使溶液的 pH 处于这个范围。记住生物化学级的水，其 pH 6.0 左右，有微弱酸性，不是精确测定核酸浓度的最好溶剂。

用这种方式测定核酸浓度时，必需使用样品量至少要达到分光光度计制造商所推荐的最低吸收值。例如，一些老式分光光度计在吸收值（OD）低于 0.1 时是不可靠的。如果使用体积较大的比色皿，尽管使用测量必需的最小体积，也避免不了样品稀释。这种稀释常常造成样品稀释过度而无法测量。尽管价格昂贵，最好还是购买体积小的石英比色皿。同样重要的是，必须清楚溶液的吸收值体现样品的核酸总量，而不是某一种核酸组分（如总细胞 RNA 混合物中的 mRNA）的单独贡献。

用 A_{260} 测定核酸样品浓度，不能了解样品的质量和纯度。如果盐过量、有蛋白质污染和/或有机溶剂过量，紫外吸收值偏离明显。因此，用 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值，能合理判断样品的纯度。纯 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 的比值是 2.0±0.1，纯 DNA 样品的 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8±0.1。不管是 RNA 还是 DNA，A_{260}/A_{230} 的比值应大于 2.0 但小于 2.4。A_{260}/A_{230} 的比值不在这个范围的说明样品有污染，必须采取一些纠正措施。通常 A_{260}/A_{280} 数值低，表明分离的 RNA 有蛋白质污染。A_{260}/A_{230} 数值低则可能有胍盐（来自细胞裂解缓冲液）或 β-巯基乙醇污染。胍盐（来自细胞裂解缓冲液）或 β-巯基乙醇污染的问题，比大多数人想象的要严重得多。除去过量胍盐的方法，是用乙酸钠和乙醇重新沉淀 RNA，然后用 70%乙醇清洗沉淀 2～3 次。如果 A_{260}/A_{230} 的比值大于 2.4，采用这种方法重新沉淀 RNA 样品。如果是植物 RNA，低 A_{260}/A_{230} 的比值可能表明有多聚糖的污染。

RNA 分离时另一个经常碰到的问题，是蛋白质去除不彻底。蛋白质的存在会增加样品在 280nm 波长的吸收值，A_{260}/A_{280} 的比值降低，是样品纯度有问题的可靠指标。若蛋白质抽提不彻底，必须将样品（DNA 或 RNA）溶于 100～200μl 消毒了的缓冲液（不含核酸酶）中，用等体积的苯酚∶氯仿∶异戊醇（25∶24∶1）抽提一次，再用等体积的氯仿或者氯仿∶异戊醇（24∶1）抽提一次。如果在下层有机相和上层水相之间有蛋白质层存在，无论这层蛋

❶ 将石英比色皿在铬酸中浸泡，再用不含核酸酶的消毒水彻底冲淋，能有效地清洗石英比色皿。操作铬酸时要极其小心。

白质多小，都清楚表明样品有蛋白质污染。若 RNA 样品体积大，可以重新沉淀提高核酸浓度。但是，这样操作是有代价的，反复沉淀会损伤样品的稳定性和回收率，还有引入核酸酶污染的风险。如果增加抽提次数是必需的，而且能够消除后续 RNA 应用所碰到的问题，那么在 RNA 分离过程中多做一次去除蛋白质污染的苯酚：氯仿抽提是值得的。RNA 沉淀用 70%～75%乙醇洗涤，用前面介绍的方法测定核酸浓度。

尽管特定样品的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 数值是核酸样品质量的优秀指标，但是核酸样品的紫外吸收谱通常是 230～320nm 之间的紫外吸收光谱也非常重要。核酸纯品的紫外吸收光谱是偏斜的钟形曲线（图 8.3），最大吸收峰接近 260nm。320nm 的紫外线吸收值是 0，即吸收光谱曲线回到基线。波长小于 230nm 的紫外吸收特性对于测定核酸浓度和纯度几乎没有意义。高质量的核酸样品的紫外吸收光谱，其波长低于 260nm 区域是上升的斜线，波长高于 260nm 区域是下降的斜线。如果只测定 260～280nm 之间的紫外吸收光谱，就很难观察到这一特征。

做这些初步分析确定核酸质量的理由是非常明显的。不用紫外分光光度计很难确定样品的核酸量，也无法比较不同样品的核酸含量。不测定 A_{260}/A_{280} 的比值，就不能迅速确定核酸样品有无其他物质污染。如果不扫描 230～320nm 之间的紫外吸收，就不知道吸收光谱曲线的形状。常常注意到，污染物除了改变 260nm 和 280nm 紫外吸收值外，还会改变 230～320nm 之间的紫外吸收曲线的形状特征。例如，过量的盐（核酸共沉淀）会掩盖 240～260nm 之间的紫外吸收光谱的正向倾斜特征。离心后迅速用 70%～75%乙醇洗涤核酸沉淀（如同一些实验方法所建议的）可以去除大部分盐[1]。前面步骤用这些盐促进核酸沉淀。有时人们用透析方法除去核酸样品中过量的盐。没有波长扫描设备，就不能迅速确定样品是否含有过量盐，也不知道过量盐对 RNA 后续应用的不利影响。

8.3.1.2　非分光光度计测定方法

若没有价格昂贵的分光光度计，或者样品的核酸含量太少，至少还有三种不够精细的方法可以用来测定样品中核酸的浓度。

① 凝胶电泳后，将待测核酸的荧光强度与含量已知核酸的荧光强度比较，用分子生物学实验室流行的图像分析软件确定核酸含量。可以从厂商购买含量已知的核酸作为标准。常用的标准是 ΦX174 DNA 或 λDNA。将这些 DNA 标准稀释后，与浓度待测的 RNA 或 DNA 一道在同一凝胶上电泳（图 8.4）。用图像分析软件确定各泳道每个条带以及拖尾的像素，将浓度未知样品的像素值与浓度已知样品的像素值比较。在本实验室，判断 cDNA 合成的效率时，通常用这种方法确定核酸浓度。这种方法确定核酸浓度速度快，结果比较准确。尤其是采用 SYBR 绿、Gel Star 和 SYBR 金等超敏物质染色凝胶，测定结果相当准确。第 11 章详细介绍了图像分析。

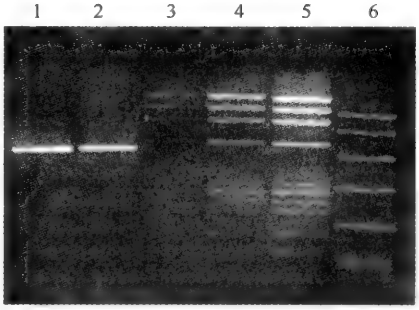


图 8.4　与标准质量的 DNA 稀释溶液比较，确定待测核酸样品的浓度。用 2.5%琼脂糖凝胶进行电泳。1 是 2μl 浓度未知的核酸溶液；2 是 1μl 浓度未知的核酸溶液；3、4 和 5 分别是 100ng、200ng 和 400ng 的 ΦX174 DNA；6 是 PCR 标准（Promega），DNA 片段分别是 1000bp、750bp、500bp、300bp、150bp 和 50bp。第 11 章详细介绍了相关的计算方法

② 另一个确定核酸浓度的方法，需要将少量的核酸样品固定于特定膜上，然后进行发

[1] 用 70%乙醇清洗特别容易除去乙酸钠（NaAc）。

色检测。可以用 DNA Dipsticks（Invitrogen，Carlsbac，CA；item K5632-01）有效定量低至 1ng 的含量很少的 RNA、寡核苷酸、单链 DNA 或双链 DNA 溶液。简要来说，首先将核酸样品稀释液点样于膜上，然后进行一系列洗涤，与发色底物一起保温。与试剂盒提供的标准颜色深度比较，确定核酸浓度。由于结合机理独特（不结合单核苷酸）、膜容量大，因此用 DNA Dipsticks 定量稀释的 PCR 扩增模板、监测反应过程等都非常方便。

③ 第三种方法是简单的肉眼观测。将浓度已知的核酸溶液和浓度未知的核酸样品上样于含有荧光染料的琼脂糖凝胶，然后电泳。在紫外线照射下，染料发出的荧光强度与核酸含量成正比。比较含量已知标准品和含量未知的待测样品的荧光强度，就可以粗略估计含量未知样品的核酸浓度。该实验需要制备含有 0.5μg/ml 溴化乙锭或 1×SYBR 绿[1]的琼脂糖凝胶。最好只取 5μl 稀释的标准样品溶液和待测样品溶液，这样可以避免样品扩散。如果上样溶液发生扩散，就很难定量。样品完全进入琼脂糖凝胶后，用紫外线透射仪或便携式紫外灯观察，评估溴化乙锭的荧光强度。也可以采用另一种方法大致估计核酸样品的浓度。取不超过 5μl 稀释后的待测核酸样品与等体积的 1μg/ml 溴化乙锭溶液或 1×SYBR 绿溶液混合，然后上样到塑料槽，用紫外线照射，其荧光强度与浓度已知的 DNA 标准比较（Wienand 等，1978）。尽管这种方法已经过时，但在经费紧张时可以用这种方法作为教学工具。

当心 与紫外线透射仪一样，便携式紫外灯对操作人员也会造成严重伤害。在紫外照射的情况下工作时，一定要佩戴合适的防护眼罩及遮住裸露的皮肤。

8.4 质量控制技术 3：RNA 样品进行 RT-PCR

PCR 已经成为分子生物学家的主流技术，获得了广泛的应用。毫无疑问，它彻底革新了大多数细胞生物学问题的研究方法。因此，各实验室都用引物和长期优化的反应条件，经 PCR 扩增转录产物或达到其他目标[2]。如果用刚制备的 RNA 样品或以前好用的 RNA 样品不能获得产物，那是令人灰心的。本实验室应付这种局面的标准做法，是用针对其他目标的引物进行扩增。而这个目标对特定来源的 RNA 样品而言，只要样品干净、RNA 分子完整就能够获得扩增产物。可以用这样的引物（如扩增 β-肌动蛋白或 GAPDH 的引物）测试 RNA 样品。结果可以证明这样的 RNA 样品是否有质量问题。如果用对照引物能够获得 PCR 产物，但是用于试验的引物不能产生 PCR 产物，就要更加理性地分析失败的原因。总而言之，用量足的 RNA 模板不能获得 PCR 产物说明 RNA 样品太差，不能进行反转录或扩增。用对照引物可以证实 RNA 样品质量是否合格。

8.5 质量控制技术 4：Northern 分析

Northern 分析是有用的实验工具。可以用 Northern 分析了解任何一种 RNA 样品的特性，并进行半定量测定。作为质量控制工具的 Northern 分析，人们用标记的 oligo(dT) 或

[1] 溴化乙锭/琼脂糖凝胶制备。先制备 1%的琼脂糖水溶液，当溶液冷却到 55℃时，加入溴化乙锭储备液（10mg/ml）至终浓度为 0.5μg/ml。仔细旋转烧瓶混合琼脂糖溶液，避免吸入水蒸气。可以将融化的琼脂糖/溴化乙锭混合物倒入 100mm Petri 培养皿中凝固。用 1× SYBR 绿替代溴化乙锭，采用相同的方法制备 SYBR 绿凝胶板。

[2] 第 19～22 章详细介绍了基于 RNA 的 PCR 技术［即反转录聚合酶链反应（RT-PCR）］。

poly(T) 探针，与总 RNA 或 poly(A)$^+$RNA 严格杂交，然后放射性成像或化学发光成像显示 poly(A)$^+$RNA 组分的大小分布。随后用更严格的条件，从印迹膜上洗去 poly(T) 探针，所以同一个印迹膜能再一次与基因特异性探针杂交。另外，如果 RNA 样品量太少，不能用传统方法（如第 7 章介绍的亲和分离）富集时，电泳前用标记的 poly(T) 探针检测少量纯化 RNA，测定 RNA 样品的 poly(A)$^+$RNA 含量。第 10 章详细介绍了这种方法。当然，也可以用基因特异性探针检测某一基因转录产物的含量，而不是用 poly(T) 探针检测所有 poly(A)$^+$RNA 含量。质量控制的目的只是证明 RNA 样品适于后续应用。

8.6　质量控制技术 5：RNA 样品进行体外翻译

生物学完整的 mRNA 能翻译该 mRNA 编码的多肽。将 mRNA 微量注射到合适的细胞（如爪蟾卵母细胞），或者将 mRNA 加入无细胞翻译系统（如网质红细胞裂解液或麦胚抽提液），能够确定 mRNA 的翻译能力。mRNA 翻译能够产生特定的、可重复的蛋白质条带。该技术就是体外翻译技术。如果有合适的抗体，体外翻译常常与免疫沉淀联用。尽管该技术在特定领域是有用的质量控制技术，但是，体外翻译技术难度高，从而很少使用。大多数常规的 RNA 应用不必采用体外翻译检测 RNA 样品的质量。

8.7　参 考 文 献

Glasel, J. A. (1995). Validity of nucleic acid monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18,** 62.

Huberman, J. A. (1995). Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240nm as well as at 260 and 280nm. *BioTechniques* **18,** 636.

Manchester, K. L. (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* **19,** 208.

Manchester, K. L. (1996). Use of UV methods for the measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques* **20,** 968.

Wienand, U., Schwarz, Z., and Felix, G. (1978). Electrophoretic elution of nucleic acids from gels adapted for subsequent biological tests: Application for analysis of mRNAs from maize endosperm. *FEBS Lett.* **98,** 319.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., and Chomczyski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22,** 474.

（刘建华　周立强译；金由辛校）

第9章　斑点印迹分析

9.1　基本原理

从培养细胞和生物组织分离高质量的RNA仅仅是基因表达研究的第一步（尽管是最关键的一步）。后续的Northern印迹分析、核酸酶保护分析、互补DNA（cDNA）文库构建、反转录-聚合酶链反应（RT-PCR）等研究所需的时间长、费用高。首次评价一个新型的模式生物、细胞、组织或实验方案时，用斑点印迹分析检测该系统的目标mRNA可能是值得的。研究人员可以用这种简单分析技术对样品生化组分做出“初步”的判断。此外，用斑点印迹方法可以确定纯化的RNA、基因组DNA，甚至cDNA能否进行杂交以及这些样品能否用于后续的鉴定。

斑点印迹，以及与它非常相近的方法即狭缝印迹能快速检测细胞裂解液或纯化RNA样品中特定RNA序列的相对含量。不需要电泳就可以了解这方面的信息。从斑点印迹结果能够估计样品中目标RNA的含量，知道这一点非常重要。后续的实验设计肯定会涉及更为精细的分析方法，包括cDNA合成或者用聚合酶链反应（PCR）进行扩增。

斑点印迹时，在多孔斑点印迹装置（图9.1）或狭缝印迹装置（图9.2）用真空过滤方式将RNA样品直接加样到膜上，然后将RNA分子固定于过滤膜表面。按膜的垂直或水平方向排列稀释的样品（图9.3），这样排列易于用图像分析软件（第11章）定量。已经用X

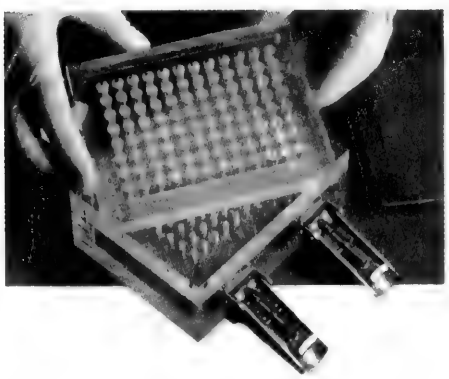


图9.1　微型多孔斑点印迹装置Ⅰ。用真空直接将样品稀释液加在过滤膜的表面。根据印迹装置模式，样品点面积是12.5mm^{2}或2mm^2。Schleicher&Schuell Bioscience惠赠

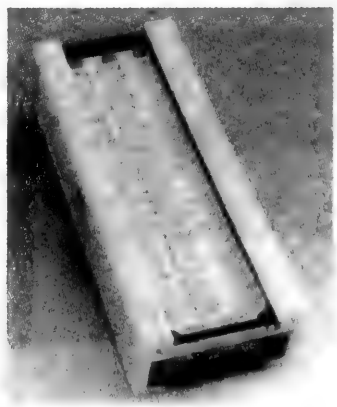


图9.2　微型狭缝印迹装置Ⅱ。用真空直接将样品稀释液加在过滤膜的表面。样品狭缝面积是6mm^2。Schleicher&Schuell Bioscience惠赠

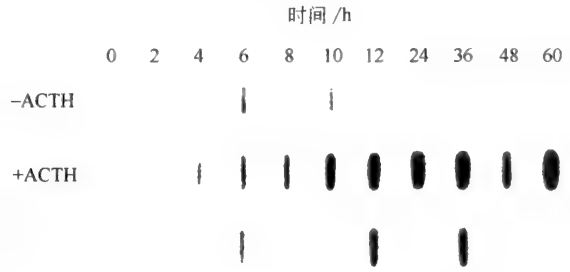


图 9.3　狭缝印迹自显影图谱。肾上腺皮质激素（ACTH）处理，短期内导致牛肾上腺皮质细胞 P-450$_{SCC}$ mRNA 浓度的增加。在图谱所指的时间收获细胞并抽提 RNA。用微型狭缝印迹装置（Schleicher&Schuell）将 RNA 上样到硝酸纤维素膜上，每份样品用 20mg RNA。然后与以 pBSCC-2 质粒为模板的缺口翻译产物杂交。最低一排的三个样品与第二排同样位置的三个样品相同。本照片由 Dr. Maliyakal John 惠赠。John M. E.，John M. C.，Ashley P.，MacDonald R. J.，Simpson E. R. 和 Waterman M. R. (1984). Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81，5628-5632

射线片记录的各个斑点或狭缝，其信号强弱反映了 RNA 样品的杂交程度。简而言之，斑点印迹杂交是无需凝胶电泳的杂交技术。

斑点印迹适于各种核酸分子检测，包括 poly(A)$^+$ RNA、细胞或细胞质的总 RNA、基因组 DNA、cDNA、PCR 产物，甚至寡核苷酸片段。目前常用斑点印迹筛选和鉴别克隆的差异表达。这些基因可能是用不同类型的差异杂交分离出来的。如果需要稀释，尤其是进行滴度检测，最好将各个稀释度的斑点按几何排列。斑点印迹装置清洗容易。如果使用得当，斑点印迹装置可以使用多年。

9.2　斑点印迹的优点和缺点

斑点印迹技术最明显的优点之一是能够快速制备杂交用的核酸样品——不需要凝胶电泳，将变性核酸样品直接加到杂交膜上。抽提制备的纯化 RNA 或部分纯化的细胞裂解液都可以用斑点印迹检测。偶尔将部分纯化的细胞裂解液印迹称为细胞斑点印迹或快速印迹（Costanzi 和 Gillespie，1987）。而且，斑点印迹模式对于一个样品不同稀释液检测非常理想。该方法速度快，能同时处理多个样品。用这种方法可以迅速了解一个或多个样品的细胞生化情况。斑点印迹模式在检测基因表达的时间过程或实验操作对基因表达的影响方面也非常有用。人们也许会将斑点印迹看作从不同组织、不同生物或完全不同的动物或植物获取 RNA 的理想方法。斑点印迹结果可以作为后续实验的基础。

多孔面板是斑点印迹或狭缝印迹装置的核心，非常适于快速制备印迹相同的滤膜。除了整个操作必须避免 RNase 活性外，斑点印迹没有什么技巧，非常容易。如果斑点杂交采用尼龙膜，可以将探针从杂交后的尼龙膜赶出。这样，又可以用这张尼龙膜与新探针杂交。如果 X 射线片不理想（用放射性同位素标记探针），可以从膜上剪下斑点，置于闪烁液中用 Cerenkov 计数，该数据（cpm）可以补充放射自显影数据。

当然也可以进行反式斑点印迹检测。反式斑点印迹是将没有标记的探针（冷）点样于滤

膜上，然后与标记 RNA 杂交，如细胞核竞争检测。这种模式能同时检测多个基因的表达。第 17 章详细介绍了这种检测方法。

斑点印迹模式是几何排列杂交结果的完美方式。在本实验室，用斑点印迹检测不同时间点的基因表达情况。这种方法进行种类检测也非常理想，检测结果用阳性或阴性表示，如样品是否与探针杂交。检测结果易于用标准的图像分析软件包分析。

斑点印迹的缺点与操作过程紧密相关。由于斑点印迹不需要进行凝胶电泳，而直接将核酸样品点在膜上，斑点印迹只能产生定量数据；信号强度只与目标基因转录产物的量有关，无法确定该基因转录产物的分子量。而且只用该方法无法判断有多少大小不同的转录产物能够与探针杂交。如果探针与核糖体 RNA（rRNA）有很弱的亲和力，斑点杂交就很成问题（因为样品含有大量 rRNA）。杂交背景高就需要理想的阳性对照和阴性对照。所有用尼龙膜、硝酸纤维素膜或 PVDF 膜进行的核酸检测，都会因核酸样品是物理固定于膜的表面，使一些分子不能进行核酸杂交，不利于定量检测。

9.3 合适的阴性对照和阳性对照

最好将斑点印迹和狭缝印迹的定量结果看作是半定量的。这种分析的最主要缺点是缺乏凝胶电泳具备的定性检测。为了使检测结果真实可靠，斑点印迹分析必须有理想的阳性对照和阴性对照，保证杂交的特异性，排除探针与膜的非特异性结合。例如，印迹时将不同浓度的 rRNA 或 tRNA 溶液置于没有使用的孔，能够显示样品的非 poly(A)$^+$ RNA，尤其是 rRNA，与探针的交叉杂交程度。而且，如果在杂交时和杂交后所采用的条件足够严格，*Hind* 酶切的 λDNA 和 *Hae* 酶切的 ΦX174 DNA（琼脂糖凝胶电泳的分子量标准）就不能与探针杂交产生可观测的杂交信号。如果没有这些常用的 DNA 分子量标准或 RNA 标准，可以采用与探针无关的任何 DNA，包括以前已经鉴定的没用的 PCR 产物。至少还有一个上样孔只加缓冲液，检测缓冲液产生的杂交信号可能也是有用的。阳性对照可以包括与目标 RNA 相同的 cDNA（与探针配对）稀释溶液。阳性对照在膜上产生的信号强度取决于溶液的稀释程度[1]。而且，好的阳性对照总是与预期一致——相同剂量阳性对照目标将产生相同强度的信号。如果首次使用这种印迹分析或用于一个新系统，强烈建议采用不同浓度的阳性对照并确定印迹检测的线性范围。例如，如果杂交信号强到无法用 X 射线自显影准确测量，印迹检测就没有用处。记住各种胶片的线性范围是非常狭窄的。

究竟用斑点印迹还是用狭缝印迹，这就要考虑样品所需点样的面积。因为样品浓缩在一个更小的表面（点的面积是 2mm^2，狭缝的面积是 6mm^2，斑点是 12.5mm^2），狭缝印迹装置能产生更好的信噪比。因此检测量少的 RNA 或丰度低的 RNA，用狭缝印迹定量更好。但是客观地说，由于这种检测本身敏感度低，不同的印迹方式所获得的结果没有太大的差异。斑点印迹数据是高级定量检测的基础。

9.3.1 实验方案[2]：RNA 斑点印迹

① **戴手套！**与 RNA 样品接触前，所有试剂必须没有核酸酶活性。

---

[1] 由于阳性对照会产生非常强的杂交信号，所以最好把阳性对照核酸稀释后上样到杂交膜上。而且，过强的杂交信号会掩盖周围的信号，最好不要把测试样品置于阳性对照周围。

[2] 所采用的方法，部分来源于 Schleicher&Schuell（1995）。

② 根据本书或其他书籍所提供的方法纯化 RNA。RNA 应当溶于无菌水或 TE 缓冲液（10mmol/L Tris-HCl；1mmol/L EDTA，pH 7.5）中。每个斑点或狭缝上样体积 100～200μl，含有 1～10μg RNA。只稀释那些本试验必须用的 RNA。记住 RNA 储存液越浓越好，－80℃保存备用。

③ 每 100μl RNA 稀释液加入 60μl 20×柠檬酸钠生理盐水（SSC）缓冲液和 40μl 37%甲醛储备液[1]。60℃温浴 15min，使核酸变性。

注意　此时要将印迹装置组装好，使变性好的核酸样品能够迅速上样到杂交膜上。

④ RNA 变性后，在灭菌水中预湿尼龙膜或其他类型的膜 5min。操作时必须戴手套，并采用最少的膜。使用前用 6×SSC 缓冲液平衡膜和两张吸水纸（Schleicher&Schuell，1995，#GB003 或其他替代物）。

注意　所需的离子强度取决于膜表面的电荷和化学组成。记住，使用前必须按照厂家指示平衡杂交膜。

⑤ 将缓冲液饱和的 GB003 吸水纸置于膜支持面板上。将尼龙膜置于吸水纸的上面，然后将样品面板置于膜上，用夹子固定。安装正确时，O 形圈与膜直接接触，孔面朝上。

⑥ 用低真空抽斑点印迹装置，保证除去膜上残余缓冲液。每个孔用 500μl 6×SSC 清洗。

⑦ 各孔加入 100～400μl 核酸溶液。如果需要，用 6×SSC 稀释核酸溶液。

⑧ 当所有的样品吸过尼龙膜后，每个孔用 300μl 6×SSC 洗一次。当所有的清洗液吸过膜后，解除真空并从印迹装置取出膜。

⑨ 根据厂家指导，将 RNA 分子固定在膜上。通常用紫外照射交联固定（见第 12 章的固定技术）。如果不马上使用，就将膜保存在凉爽、干燥、避光的地方。

⑩ 预杂交封闭、探针杂交和杂交后严格清洗（具体操作在第 14 章介绍）。

⑪ 用适当的方法检测，具体方法取决于探针标记（第 15 章加以讨论）。

9.3.2　实验方案[2]：DNA 斑点印迹

斑点印迹分析核酸速度快，这套技术也适用于 DNA 鉴定。DNA 斑点印迹与前面介绍的 RNA 斑点印迹一样，唯一的区别是双链 DNA 的变性方法不同。前面提到的 RNA 斑点印迹应注意的事项同样适宜于 DNA 斑点印迹。

① **戴手套**！与 DNA 样品接触前，要保证所有试剂没有核酸酶活性。

② 用普遍使用的方法纯化基因组 DNA 或合成的 cDNA。大多数常规检测使用的基因组 DNA 储存液浓度是 1.0mg/ml。DNA 应溶于 pH 8.0 的 TE 缓冲液（10mmol/L Tris-HCl；1mmol/L EDTA，pH 8.0）中。用真空将含有 5～10μg 的 DNA 溶液（100～200μl）加入斑点或狭缝的上样孔中。根据需要用 TE 缓冲液或无菌水稀释 DNA 样品。

注意　检测单拷贝序列时，可能需要在每个孔里加入更多的 DNA。

③ 每 100μl 溶于 TE 缓冲液的 DNA 溶液，加入 10μl 2mol/L NaOH，37℃温浴 10min。然后加入 40μl 20×SSC。如果不立即上样到杂交膜上，需要将 DNA 混合液置于冰上。也可

---

[1] 每次使用前，甲醛（HCHO）必须是刚刚去除蚁酸后去离子化的，pH 高于 4.0。使用前，甲酰胺（$HCONH_2$）也必须去离子化。甲醛和甲酰胺都有毒，必须根据厂家提供的安全方法（MSDS）小心操作。

[2] 所采用的方法，部分来源于 Schleicher&Schuell（1995）。

以不加 20×SSC，而加入等体积的 2mol/L NH_4Ac（pH 7.0），将 DNA 溶液于冰上放置。

注意 1 在这个时候应当将斑点印迹装置组装起来，这样可以马上将变性后的 DNA 样品加在杂交膜上。

注意 2 最好尽快将变性后的样品加在杂交膜上，从而避免变性后的单链分子重新退火。

④ 在 DNA 变性时，用无菌水预湿尼龙膜或其他杂交膜 5min。操作时要戴手套，使用的杂交膜面积要尽量小。使用前用 6×SSC 缓冲液平衡杂交膜和两张吸水纸（Schleicher& Schuell＃GB003 或其他替代物）。

注意 所需离子强度取决于膜的化学成分和表面电荷。最好照厂家的操作手册平衡杂交膜。

⑤ 把缓冲液饱和的 GB003 吸水纸置于斑点印迹装置的膜支持面板上。把尼龙膜置于吸水纸上，再将样品面板置于膜上，并用夹子固定。组装正确时，O 形圈和膜直接接触，并且上样孔面朝上。

⑥ 采用低真空排出斑点印迹装置中杂交膜上残余的缓冲液。每个上样孔用 500μl 6×SSC 溶液清洗一次。

⑦ 每孔上样 100～400μl DNA 溶液。如果需要，DNA 溶液用 6×SSC 稀释。

⑧ 当所有的 DNA 溶液流过尼龙膜后，各孔用 300μl 6×SSC 清洗。当清洗液流过杂交膜后，解除真空并从斑点印迹装置取出杂交膜。

⑨ 根据厂家的指导将 DNA 固定于杂交膜上，常用紫外照射交联的方法进行 DNA 固定（见第 12 章的固定技术）。如果不立即使用，杂交膜应该保存在凉爽、干燥、避光的地方。

⑩ 预杂交封闭、探针杂交和杂交后严格清洗（具体操作在第 14 章介绍）。

⑪ 用适当的方法检测，具体方法取决于探针标记（第 15 章加以讨论）。

9.4 斑点印迹数据的局限性

斑点印迹数据的最大局限是：①没有进行凝胶电泳，不能进行定性检测；②受检测模式的影响，灵敏度不如基因表达检测的其他标准方法。研究人员还要敏锐地意识到，高浓度核酸溶液，包括悬浮在高盐缓冲液中的核酸溶液，上样到斑点印迹装置时很容易堵塞杂交膜。而且负载过量的样品孔，会造成“点饱和”，此时上样的核酸量可能超过了膜的最大容量，或者使用了能降低膜结合能力的试剂稀释核酸溶液。

尽管是半定量，但是斑点印迹还是有一个较窄的线性范围。因为斑点印迹操作时核酸溶液的上样量很容易超过膜的结合容量，加之 X 射线胶片线性范围狭窄，导致斑点印迹线性范围狭窄。信号强度大的样品很容易弄坏胶片，使斑点之间完全模糊。记住图像分析软件只能分析提供的图像，所以应尽可能减少这些不确定性。基于这些原因，至少在首次分析没有鉴定过的生物材料时，强烈建议要稀释各个样品，以确定各样品的动力学范围。放射自显影或化学发光检测后，如果图片各点需要用数字表示的话，割下每个样品点测定其 cpm 值。尽管这样获得的额外数据可能很有用，但是切割后的膜不能重复使用。正如以前所述，没有一种方法能够检测膜上特定点交叉杂交。精巧设计的阴性对照和阳性对照能增加检测的说服力，但是这些对照只能提供检测忠实性的间接证据。

最后，因为合成 cDNA、RT PCR、凝胶电泳和核酸印迹等相对容易，现在开始研究用斑点印迹可能不再是最好的选择。斑点印迹是一种“图形”实验：一组表示杂交样品的点看

起来很漂亮，但实际上是在构筑数据。如果需要排列成几何图形进行检测，就把样品按顺序点样，然后杂交检测。如果需要更准确定量，则要选择其他检测方法。

9.5 参考文献

Costanzi, C., and Gillespie, D. (1987). Fast blots: Immobilization of DNA and RNA from cells. *In* "Guide to Molecular Cloning Techniques" (S. L. Berger and A. R. Kimmel, Eds.). Academic Press, San Diego, CA.

Schleicher and Schuell. (1995). Nucleic acid dot/slot-blots onto s&s transfer media. *In* "Blotting, Hybridization, and Detection," 6th ed. pp 20–22 Schleicher & Schuell, Keene, NH.

（刘建华　周立强译；金由辛校）

第10章 电 泳

当心 电泳所用的高压电对身体会有潜在的伤害。使用这些电泳仪器时应当非常小心。

10.1 基本原理

众多离散基因与复合基因的表达，以及机制不同的调节，构成了和谐的细胞生化反应过程。研究突出转录事件的一个基本方法，就是以信使 RNA(mRNA) 及其前体核不均一 RNA(hnRNA) 作为基因表达参数进行研究。这种方法的前提是建立在这样的基础之上，即某种特定 RNA 的丰度变化，可以反映细胞周期中的重要生化事件。

该方法的核心是核苷酸探针能够高度严格地区分外源 RNA 分子混合物中的不同个体。可以建立起促进目的 mRNA 与互补核酸探针杂交的条件，对目的 RNA 进行快速的定性与定量分析。

电泳是一种常规的实验方法。电场中，带电分子根据其不同的分子量分开。Northern 分析、S1 核酸酶保护分析以及其他各种形式的定量反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分析，都要使用电泳的方法来检验稳态 RNA[1] 分子的大小及丰度。电泳是一种通用的方法，以任何方法提纯的 RNA 样品，都可以通过电泳来分离 (RNA 提纯方法见第 5 章、第 6 章)。例如，在被称作 Northern 印迹的分析中，无论是全细胞 RNA 样品、全细胞质 RNA 样品，还是 poly(A)$^+$ RNA 或是 poly(A) RNA 样品，都需要通过电泳进行分离。然后再转移并固定到尼龙膜或硝酸纤维素膜等膜的表面 (Alwine 等，1977，1979)。这些带有印迹的膜，将和与某种目的 RNA 互补的探针进行杂交。与 Southern 分析 (Southern，1975) 的差异，就是研究对象的区别。同样要经过电泳分离、转膜和杂交的 Southern 分析，针对的是 DNA 样品。电泳至今仍是按分子大小区分 RNA 的一种好方法，除非涉及大量 RNA 分子的分析，如生物物理研究才会受到限制。

10.2 核酸的标准化

电泳或任何并行分析，在准备 RNA 样品前，要确保 RNA 的标准化。也就是说每个泳道中样品的量应当相同。然而，样品的标准化到底指的是哪些方面？总细胞 RNA、总细胞

[1] 稳态产物 RNA，是细胞或亚细胞部分，如细胞核或细胞质内，最终累积的所有的 RNA。只研究稳态 RNA 并不能反映出转录速度或转录本周转速度这些参数。详见第 17 章。

质 RNA 以及 poly(A)$^+$ mRNA 的标准化方法相同吗？标准化必须能够提供一个合理恰当的依据，使每次电泳样品的信号强度都有可比性；能够根据已有的阳性对照和阴性对照，阐明样品信号的意义。

在核苷酸电泳样品的标准化过程中，要注意以下三点。

① 以核苷酸样品总质量作为标准。也就是说，以浓度最低的样品作为基准，其他样品都要稀释到这一样品的浓度。

② 电泳及染色后目测 RNA 样品条带。确认每个样品都是完整的，且不同样品的核糖体 RNA(rRNA) 丰度一致。要注意的是，按①进行的标准化操作，如在各个泳道中上有等量的 RNA，并不能解决所有问题。注意这一点是重要的，即与转录对照相比，rRNA 是更好的上样量的对照。

③ 对“看家基因”（这个基因的表达不受实验刺激及操作的影响）RNA 进行杂交来验证标准化。通常选用的看家基因有 β-肌动蛋白 (β-actin)、纤连蛋白、组蛋白、GAPDH 以及转铁蛋白受体 mRNA。甚至有人会用 tRNA 来进行标准化。读者应当注意的是，由于不同细胞对外界刺激的反应不同，因此某种情况下用来进行校准的转录本可能不会适用于其他情况。用作校准的转录本，因为实验刺激，在转录或者转录后发生任何细微的改变，都会造成对细胞内生化过程认识上的变化。这些对基因表达的评估将在第 13 章内部对照部分论及。

用分光光度法来检测每个 RNA 样品的浓度，使每个泳道的 RNA 质量 (μg) (A_{260}) 相同，是使用最广泛的标准化方法。在有 poly(A)$^+$ RNA 时，每个泳道上 2～5μg 样品即足以检出很多低丰度 mRNA。反之，每个泳道则需要加入 15～20μg 的总 RNA 或总细胞质 RNA。某些特殊系统里，poly(A)$^+$ RNA 产量过低，以致无法使用传统的 oligo(dT) 柱层析时，则可用总 RNA 来进行检测。并且，通过富集 poly(A)$^+$ 纯化得到的 mRNA 样品，往往含有其他非 poly(A) 污染。用总 RNA 来进行电泳检测的其他理由，是因为研究的目的 RNA 丰度足够高，不用进行 poly(A) 富集就能检测出来。最后，因为任何一种分离方法的效率都不会高达 100%，用于纯化 poly(A) 的步骤实际上会降低低丰度和极低丰度 mRNA 的量。

核糖体 RNA(rRNA) 是总细胞 RNA 和总细胞质 RNA 的主要成分，占到样品总量的 80%～85%。它的含量远高于 mRNA 的含量 (2%～3%)。因此即使 mRNA 含量有很大变化也不易在紫外分光光度计下检测出来。但是，精确的样品标准化方法需要确保特定 mRNA丰度变化能够真实反映该 RNA 转录或转录后的调节情况 (相对于所有 RNA 的转录)，且这些检测到的变化是有意义的。这也是所有基于组分含量的标准化方法需要考虑的。

为了更好地阐述要考虑到的各个方面问题，现在以 poly(A)$^+$ RNA 为例。尽管存在第 7 章 poly(A)$^+$ 部分中详细列举的种种不足，但是，在每个泳道中加入等量的 poly(A)$^+$ RNA (兼有 hnRNA 和 mRNA)，仍不失为一种可接受的标准化样品的方法。而这一点也不总是能够实现。若是可利用的 RNA、细胞或是组织太少，不能进行 poly(A)$^+$ RNA 富集，还可以用另一种方法来进行校准，即用合成的 poly(T) 标记探针来进行标准化 (Fornace 和 Mitchell，1986；Hollander 和 Fornace，1990；Farrell 和 Greene，1992)。用合成 cDNA 方法制备的探针可用于估测样本中所有 poly(A) 组分。以下是这一高超技术的过程：进行标准化校准时，取少量总 RNA (500 ng 或更少) 进行狭缝印迹或斑点印迹分析。检测到的 poly(T) 探针杂交结果就反映了样品中的 poly(A)$^+$ 含量 (图 10.1)。样本与样本之间可以通过比较杂交信号的强度来校准总 RNA 量，以使每个泳道中的 poly(A)$^+$ 相等。这一校准方法

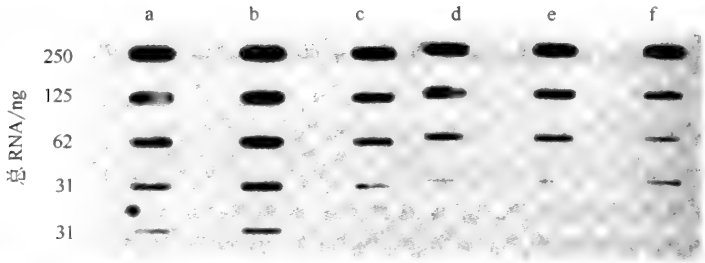


图 10.1 用狭缝印迹杂交校准样品总细胞质 RNA 中的 poly(A)$^+$。用磷酸缓冲液对 500ng(A_{260})样品连续进行 2 倍稀释。每狭缝上样 100μl，与^{32}P 标记的 poly(T) 探针杂交。用这种方法来证明，未经 oligo(dT) 处理的等质量总 RNA 样品中，含有等量的 poly(A)$^+$mRNA。放射自显影后扫描光度测定的结果表明，尽管各狭缝中含有的总 RNA 量相同，但是这些样品中所含的 poly(A)$^+$有 2～4 倍量上的差异

也适用于其他需要精确校准的分析方法。这种方法相当于用 UV 分光光度计对纯化后的poly(A)$^+$RNA 进行标准化处理。假如不能正确地按照 poly(A)$^+$RNA 的量来进行标准化处理，就会导致由于每个泳道中加入不同 poly(A) 量而造成实验观测的误差。

关于几种样品的标准化问题，需要记住的最重要的一点是，RNA 电泳与 Northern 分析虽然是古老的传统技术，但是它们已经非常接近于作为基因表达参数的 RNA 测量方法中灵敏度指标的下限。RNA 电泳是 Northern 分析的初始步骤，应当能够粗略估计出细胞中的转录情况；对基因表达精确分析的需求，则要求研究者使用极其灵敏的 RT-PCR 技术。

10.2.1 实验方案：poly(A) 的标准化

(1) 样品的准备

① 50mmol/L、pH6.8 磷酸钠缓冲液（50mmol/L $Na_xH_yPO_4$）置冰上待用（该缓冲液由单碱盐和二碱盐混合制备，见表 10.1）。取 500ng(A_{260})RNA，用该缓冲液稀释到 200μl。

表 10.1 $Na_xH_yPO_4$ 缓冲液的配制

NaH_2PO_4/ml	Na_2HPO_4/ml	pH	NaH_2PO_4/ml	Na_2HPO_4/ml	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.9	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

注：这些是配制特定 pH 值的磷酸钠缓冲液时 200mmol/L NaH_2PO_4 与 Na_2HPO_4 的理论比例。需要测定 NaH_2PO_4 与 Na_2HPO_4 混合稀释后的 pH 值，通常需要微量地调节 pH 值。详见正文部分。

② 用狭缝印迹杂交或者斑点印迹杂交时（Schleicher 和 Schuell Biosciences），尼龙膜先用无核酸酶的水湿润，再用磷酸钠缓冲液平衡。每个样品取一半（100μl＝250ng）点样到

膜上。

注意 将样品集中于较小的上样面积可得到较好的定量数据。因此，与斑点印迹杂交相比，狭缝印迹杂交更好。

③ 在剩下的 100μl RNA 样品中，加入 100μl 磷酸钠缓冲液，使其稀释两倍。用印迹法通常进行五轮两倍稀释的样品量就足以对样品进行精确的校准。

④ 用 300μl 的磷酸钠缓冲液洗孔两次。

⑤ 可用商品化的 poly(A) 稀释后作为阳性对照使用，稀释多轮的商品化的 poly(A) 可以作为估计样品中 poly(A)$^+$ 绝对量的标准。稀释同样倍数的 tRNA 可用来做阴性对照。

⑥ 按照厂商说明固定 RNA，最好用紫外照射交联法。进行下一步预杂交或是将其存放于干冷的地方。

(2) 预杂交方法 1

⑦a. Church 印迹法 (Church 和 Gilbert，1984)：滤膜在预杂交液 (1% BSA，1mmol/L EDTA，0.5mol/L $Na_xH_yPO_4$，7% SDS，pH7.2) 中，65℃平衡至少 20min。预杂交液的最小用量为 100μl/cm^2。进入步骤⑧。

(3) 预杂交方法 2

⑦b. 将滤膜浸在 5×SSPE 中至少 15min 后，按至少 100μl/cm^2 的量加入预杂交液 (5×SSPE，5×Denhardt 溶液，0.1% SDS，100μg/μl 变性的鲑精 DNA，50%的甲酰胺)，42℃预杂交 2～3h。

注意 因为 SSPE 中的磷酸基团与核酸中的磷酸二酯键很相似，并且能帮助对滤膜的封闭，所以预杂交液中用 SSPE 代替 SSC 会得到较低的背景值。另外，用杂交炉 (Lab-Line) 会得到较好的数值。

(4) poly(T) 探针的合成

⑧ 对 poly(A) 模板进行反转录得到的第一链 cDNA，可作为实验中所需的 poly(T) 探针。典型的反转录体系 (100μl) 含有以下组分：250ng/μl poly(A)；2mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)；50mmol/L Tris-Cl，pH8.3；40mmol/L KCl；10mmol/L $MgCl_2$；0.5U/μl RNasin(Promega)；1mmol/L dTTP；0.05μg/μl 的 $dT_{12\sim18}$ 寡核苷酸；100μCi[α-^{32}P]TTP (3000Ci/mmol)❶；5U/μl AMV 反转录酶。尽管用 dTTP 而不是 dNTP 的混合液可以得到特异性很高的 cDNA，但是任何一种 cDNA 合成试剂盒都可用来进行上述反应。探针长度约为 200～300bp。另外，非同位素标记的 poly(T) 探针可用第 13 章中的方法合成。

⑨ 42℃保温 1.5h。

⑩ 用 100mmol/L NaOH 与 10mmol/L EDTA 的混合液终止反应。将样品在 65℃保温 20min 以水解其中的 poly(A) 模板。

注意 该方法与从 cDNA 经典合成方法中除去模板 RNA 的步骤相同。

⑪ 室温下用 pH7.5、100mmol/L Tris-Cl 中和碱性的反应混合物 15min。

⑫ 需要将标记的探针与未掺入的放射性核苷酸及其他反应组分分开。可用离心柱层析进行纯化 (Sambrook 和 Russel，2001)，如将样品过 Sephadex G-25 柱 (Amersham Biosciences)，也可以用其他商品化的浓缩纯化试剂盒来分离。暂未使用的探针 (及含有杂交缓冲液的探针) 应在适当屏蔽下于－20℃保存，在这样的温度下可以存放 4～6 周。

❶ 虽然检测需要的时间较长，但也可以用 250μCi[^{35}S]TTP 5′-(α-S) 来标记探针。1Ci=37GBq。

（5）杂交

⑬ 弃去原有的预杂交液，换上用量不超过 100μl/cm² 的新鲜的预杂交液。加入浓度为 100ng/ml 或 1×10^6 cpm/ml 的 poly(T) 探针。

⑭ 44℃温和振荡 3～4h。

（6）杂交后的洗涤

⑮ 杂交结束后移去探针溶液。可以冷冻保存使用过的探针溶液，并再次用于以后的杂交分析。如果使用了 Church 缓冲液来进行预杂交或杂交（预杂交方法 1），则用 200mmol/L NaCl 在室温下洗涤滤膜两次，每次 10min；然后 44℃洗涤 30min；最后，用 75mmol/L NaCl 室温洗涤 5min。如果杂交使用的是含有 SSPE 的缓冲液（预杂交方法 2），则用 2× SSPE、0.1% SDS 在室温洗涤两次，每次 10min；再用 0.1×SSPE、0.1% SDS 缓冲液 37℃洗涤两次，每次 10min。为了保证洗涤能充分有效，每次洗涤至少使用 100ml 缓冲液。

⑯ 除去滤膜上过量的洗涤缓冲液。将滤膜探针面向上放在 Whatman 3mm 滤纸上 20～30s。勿使滤膜干透。

⑰ 用保鲜膜包好湿的滤膜，即可进行放射自显影[1]。如果用上增感屏，这类杂交只需在 −70℃下曝光过夜便能得到很强的信号。

注意 自显影后，可以用 Cerenkov 计数来对各个稀释样品定量：从膜上剪下每个稀释组分（也就是说每个斑点或狭缝），直接加入闪烁液进行检测。

⑱ 每个 poly(A) 的含量可由 poly(T) 杂交程度定出，这样全细胞 RNA 或全细胞质 RNA 的量即可根据一个参比样品而进行标准化校准。许多情况下参比样品会是一个对照或者未经处理的样品。这样标准化的 RNA 样品即可用于电泳。

10.3 琼脂糖凝胶电泳中 RNA 样品变性方法

体内的 mRNA 分子，本质上是以单链多核苷酸形式与细胞质蛋白质结合，组成信使核糖核蛋白体（mRNP）颗粒。这些 mRNP 被认为是细胞内 mRNA 的天然存在形式，展示了重要的二级结构。这是 RNA-蛋白质之间的相互作用和互补序列之间碱基配对形成的结果。事实上，现在认为所有 RNA 分子中都含有短的双链螺旋区域，除了标准的 A∶∶U 和 G∶∶∶C 配对之外，还有较弱的 G∶∶U 配对。通常这些分子间和分子内的相互作用程度，被认为调节了转录本在细胞质中的可翻译性（综述见 Lewin，2004）。并且，有不断增加的证据表明，在 mRNA 的近 5′端或是中部暂时形成的双链区域，会严重影响 mRNA 的可翻译性。本质上，这也是反义核酸和 RNA 干扰（RNAi）技术的作用基础。无论是阻止 mRNA 5′末端与翻译机器的相互作用，或是单纯地剪切 mRNA，都造成 mRNA 不能被翻译。

分子构象是控制核酸在电场内迁移的参数之一，二级结构或是 RNA 发夹结构会影响原本基于分子量的电泳分离。有些 RNA 分子，如 tRNA 就是一个主要的例子，它含有许多自身互补的序列，整个分子作为一个整体呈现出极有特征性的、很容易识别的、并拥有惊人稳定性的三级结构。因此，分子内碱基配对程度不同的同种 RNA，向正极迁移的速度是不同的。这就造成不同 RNA 转录本在电泳时表现为拖尾。为了克服这个问题，RNA 样品通常会在变性条件下电泳，仅仅加热是无法解决二级结构问题的。成功的 RNA 电泳需要两个条

[1] 检测方法与化学发光法不同。见第 15 章。

件：①RNA 在上样之前已经变性；②电泳过程中的条件可支持并维持 RNA 已变性的状态。如果没有其他问题，记住了，制备尽可能薄的凝胶和在低电压下电泳，可以得到最好的电泳结果。

选择何种变性系统主要取决于实验的目的。总的来说，凝胶和变性剂的选择，是一个需分离 RNA 分子大小的函数，并且受到实验目的不同的影响，如为了制备还是严格分析 RNA 的本质。小分子核酸（小于 500 碱基或碱基对）最好用聚丙烯酰胺凝胶（3%～20%）(Maniatis 等，1975)。通常 S1 核酸酶保护实验（Berk 和 Sharp，1977；Favaloro 等，1980；Sharp 等，1980）、RNase 保护实验（Zinn 等，1983；Melton 等，1984）和 DNA 测序需要这样的操作。但是，Northern 分析的研究对象，是数千种分子量各不相同的转录本混合样品。此时，1.0%～1.2%的变性琼脂糖凝胶，能够达到在电泳分辨率及转膜（印迹）效率之间的最佳平衡。

在琼脂糖凝胶电泳中，最常用的 RNA 变性剂有甲醛[1]（Boedtker，1971；Lehrach 等，1977；Rave 等，1979）和乙二醛/二甲基亚砜（DMSO）（Bantle 等，1976；McMaster 和 Carmichael，1977；Thomas，1980）。历史上最早用于琼脂糖凝胶电泳的 RNA 变性剂是羟基甲基汞（methylmercuric hydroxide）系统。具有讽刺意味的是，尽管它是到目前为止最有效的变性剂（Gruenwedel 和 Davidson，1966），却也是迄今毒性最高的一个。由于羟基甲基汞的毒性（毒性综述见 Junghans，1983）问题，目前已不再使用它。现在，就聚丙烯酰胺凝胶而言，成功使用的 RNA 变性剂是甲酰胺[2]（Spohr 等，1976）和尿素（Reijnders 等，1973）。每种变性系统都有各自独特的性质、安全要求和优缺点。本章讨论了甲醛和乙二醛/二甲基亚砜系统。因为使用羟基甲基汞的难度和对健康的危害，所以并不推荐使用它，因此这里也不再讨论它的使用方法。

10.3.1　甲醛变性法

甲醛和甲酰胺是常用的 RNA 变性剂。它们不仅是致癌剂而且还是致畸剂，因此应该在通风橱中进行操作，并且孕妇应该避免使用。为了确保 RNA 的泳动仅与它的分子量相关，RNA 样品在电泳前必须用甲醛和甲酰胺联合变性，而且电泳时凝胶内需要有甲醛来维持变性的状态。甲醛的储存浓度通常为 37%(12.3mol/L)，并含有 10%～15%的甲醇作为防腐剂。甲醛在深棕色的瓶中于室温下保存，应避免阳光直射。甲醛与空气接触后会被氧化，因此每次使用前都应检测 pH 值；由于 pH 小于 4 时，RNA 会大量降解，所以用于 RNA 的甲醛，其 pH 值必须大于 4.0。可像甲酰胺那样，对甲醛进行去离子化处理，以提高其 pH 值（附录 7）。杂交步骤前，很难从 RNA 中完全除去变性剂乙二醛，这可能是很多实验室里，甲醛变性系统比乙二醛系统具有更高灵敏度的原因。大多数实验室都选用甲醛变性系统来进行 RNA 电泳。

甲醛凝胶的电泳缓冲液是 1×MOPS，通常配制成 10×储备液（400mmol/L MOPS[3]，pH7.0；100mmol/L NaAc；10mmol/L EDTA，pH8.0），在高压灭菌后呈淡黄色。与以往观点不同的是，将 MOPS 缓冲液高压灭菌，并不影响它作为电泳缓冲液的功能。或者，也

[1] 警告：甲醛是一种致癌剂和致畸剂。

[2] 警告：甲酰胺是一种致癌剂和致畸剂。

[3] MOPS 为 3-(*N* 吗啉代)-丙磺酸 [3-(*N*-morpholino) propane sulfonic acid]。

素膜将 MOPS 缓冲液过滤两次，以除去其中的核酸酶活性，延长其储存期。胶的硬度，较其他琼脂糖凝胶低，而且更易滑落。转移该凝胶时最好用抹刀把凝胶托起。本章 10.8 节的内容，对初次进行 RNA 电泳的人会有帮助。

10.3.2 实验方案：甲醛变性胶

① **戴手套！**

② 配制 200ml 的琼脂糖凝胶溶液（足够配制两块 12cm×14cm 的凝胶）。将 2.4g 琼脂糖粉与 170ml 蒸馏水置于锥形瓶，用热盘或微波炉加热使其溶化。轻轻旋转摇动锥形瓶，确保琼脂糖完全溶解，不溶的琼脂糖会呈“鱼眼”状。温度降到 55～60℃时，加入预热的 20ml 10×MOPS 与 10ml 甲醛（37%）。这样得到的是 1×MOPS、0.6mol/L 甲醛、1.2%的琼脂糖凝胶。在倒胶制板前，琼脂糖溶液于 55～60℃温育，注意在锥形瓶上盖上瓶盖以防止甲醛的挥发。

注意 以前一些旧的操作手则中，建议使用终浓度为 2.2mol/L 过高浓度的甲醛。目前很多操作者都使用不超过 0.6mol/L 的甲醛，如有需要也可降到 0.22mol/L。

③ 用第②步中配制的溶液来灌注厚度为 0.5～0.75cm 的胶。在通风橱中倒胶，以尽可能减少甲醛挥发到室内。凝胶越薄，RNA 的分离效果越好。

④ 将要电泳的样品，按照以下方案在灭菌过的小离心管中混合：

4.7μl RNA（总量 20μg）

2.0μl 5×MOPS 缓冲液

3.3μl 甲醛

10.0μl 甲酰胺

用枪充分混合后离心，将这些组分甩到管底。

注意 1 每个孔中 RNA 的上样量不要超过 20μg，超过此上样量可能会引起样品丢失，并降低分辨率。如果目的 RNA 的丰度极低，则每个孔中需要加入 4～5μg 的 poly(A)$^+$ RNA。

注意 2 使用新鲜去离子化的甲醛和甲酰胺。

⑤ 按照第④步中的方法准备 4～5μg 的标准分子量 RNA。

注意 这些用作标准的 RNA，是体内转录而来的单链分子，使用前也需要变性。

⑥ 将所有的样品及标准分子量 RNA 55℃加热 15min 或 65℃加热 10min 变性。

⑦ 在 RNA 保温变性过程中，一旦凝胶凝固即将其转移浸没在 1×MOPS 电泳缓冲液中。

注意 要用最少量的电泳缓冲液覆盖琼脂糖凝胶。轻轻地将梳子垂直向上拔出。在拔梳子之前，就把胶浸入到缓冲液中可润滑加样孔，减少梳子拔出时的真空作用。假如没有将缓冲液覆盖在胶上，拔梳子时过大的气压可能会使加样孔底部受损。

⑧ 变性后在样品中加入 2μl 10× 上样缓冲液（50%甘油；1mmol/L EDTA，pH8.0；0.25%溴酚蓝[1]），充分混合，离心后立即上样。

注意 样品变性保温过程中，会有部分样品残留在离心管的内壁，所以加上样缓冲液之前应先将样品离心一下。

---

[1] 上样缓冲液中，也可以用终浓度为 0.25%的二甲苯胺作指示剂。但电泳后，二甲苯胺会干扰对 RNA 和 DNA 的观察，特别是当目的条带就在二甲苯胺位置时，该现象更明显，因此不推荐使用。

⑨ 两电极之间的最大电压降为5V/cm。溴酚蓝迁移到离凝胶末端1～2cm时即可停止电泳。

注意 推测未知分子量的RNA样品时，就应当电泳到这个位置。在后续的实验中，根据经验估计何时停止电泳，只要不使目的RNA跑出凝胶即可。

⑩ 电泳结束后，凝胶可以用0.5μg/ml溴化乙锭的水溶液或1×MOPS溶液；或1×SYBR绿Ⅱ的1×TAE或1×TBE溶液；或1×SYBR金的1×TAE或1×TBE溶液染色，观测凝胶内的RNA分子。染色技术及方法选择将在本章后面详细阐明。

注意 用溴化乙锭染色甲醛变性胶时，通常会有很高的背景，甚至到RNA条带模糊的地步。这是因为凝胶内含有甲醛。凝胶会呈亮橙色或粉色，凝胶中所有的核酸因此变得模糊不清。可以用DEPC处理的蒸馏水或5×SSC脱色2～3次，每次10min以去除甲醛。

⑪ 不管用什么方法染胶，都需要将凝胶浸在5×SSC或蒸馏水中，以去除其中的甲醛。通常把凝胶浸泡在新鲜的缓冲液或蒸馏水中20～30min，期间换几次缓冲液即可充分去除凝胶里的甲醛。或者可以把凝胶浸泡在300ml蒸馏水中，4℃存放过夜。

⑫ 这样的凝胶就可以拍照保存。

10.3.3 乙二醛/二甲基亚砜变性法

另一种常规变性方法，是将RNA样品与1mol/L乙二醛和50%（体积分数）DMSO的混合物50℃保温1h（Bantle等1976；McMaster和Carmichael，1977）。乙二醛化（Salomaa，1956）会在鸟苷残基上增加一个环，在空间上干扰G∶∶∶C碱基配对（Hutton和Wetmur，1973）。高浓度的乙二醛可与RNA和DNA中的所有碱基作用（Nakaya等，1968）；但是鸟苷酸-乙二醛的加成物是其中最稳定的（Shapiro等，1970；Broude和Budowsky，1971）。这种RNA处理方法排除了甲醛（当然还有羟基甲基汞）对身体的潜在危害。但与甲醛系统不同，不需要将乙二醛加到凝胶中。通常在电泳前，RNA样品中加入乙二醛使RNA变性。虽然乙二醛使RNA变性的效果较好，但是乙二醛的准备、样品的变性及Northern滤膜的处理都很麻烦，所以大多数工作者仍采用甲醛变性系统。

乙二醛的氧化速度很快，因此在使用前，需要将乙二醛储备液（40%乙二醛，6mol/L）去离子化，并将pH值调到中性。假如不做去离子化处理，乙二醛的氧化产物乙二酸会使RNA降解为片段。为了使用方便，可将去离子化的乙二醛分装于密闭小管中－20℃存放。融化了的去离子化乙二醛，只能使用一次，没用完的部分应当丢弃。

乙二醛化的DNA与RNA分子，它们的电泳速度相当（McMaster和Carmichael，1977）；因此，已知分子量的小分子DNA可用作未知RNA的标准分子量对照。例如，三种限制性内切酶（*Pst*Ⅰ、*Pvu*Ⅱ、*Hind*Ⅲ）消化长度为4361bp的质粒pBR322，可以产生三个长度为779bp、1545bp和2037 bp的双链片段。在没有合适的RNA分子量标准时，这些用乙二醛处理过的片段就非常有用。并且，如果目标探针被克隆到pBR322或其他与pBR322同源的载体里，这些消化制备的片段就可作为目标片段与探针杂交，在放射自显影时产生永久的标准分子量影像[1]。同样的方法，也可用于Southern杂交，并且可以用任何其

[1] 当用质粒片段作为分子量标准时，杂交后从放射自显影或者化学发光法测得的信号都非常强。这样标准分子量的信号就会影响相邻泳道的信号，可能会模糊目的条带。如果希望照片上有标准分子量泳道出现，通常建议上样量不超过25ng。

他已知 DNA 序列的质粒制备分子量标准。

与甲醛变性的样品相比，乙二醛化的核酸样品电泳速度较慢，但条带更锐利。乙二醛变性胶最大的缺点是，标准电泳缓冲液（10mmol/L 的磷酸钠，pH7.0）的缓冲能力较弱。因此为了防止形成 pH 梯度，分离 RNA 样品时，乙二醛变性胶的电泳速度应当比甲醛变性胶的慢。过去选用磷酸钠缓冲液，是因为 pH7.0 时缓冲液中的离子强度较低，因此不需要往凝胶中加入变性剂就能够维持乙二醛的最大变性效果。磷酸钠缓冲液不能抵抗溶液 pH 值的快速改变，所以电泳时需要保证缓冲液的持续循环来维持 pH。因为 pH 大于 8.0 时，乙二醛就会与 RNA（和 DNA）解离（Thomas，1980），并且 RNA 样品对碱敏感，易于水解，因此上述做法就很必要。购买电泳槽时，可以方便地选择很多有缓冲液进出口的、能支持缓冲液循环的产品。假如配置无法支持缓冲液循环，尽管操作非常麻烦，也必须每隔 30min 切断电源更换一次缓冲液。另外，也可以用 1×MOPS 缓冲液代替磷酸钠缓冲液来进行电泳，这样可以降低乙二醛变性胶对缓冲液循环的要求。本章 10.8 节的内容，对初次进行 RNA 电泳的人会有帮助。

10.3.4 实验方案：乙二醛化与 RNA 电泳

（1）前期准备：磷酸钠缓冲液的配制

将 NaH_2PO_4（单碱盐）与 Na_2HPO_4（二碱盐）储备液，按照合适的比例混合以配制特定 pH 值的磷酸钠缓冲液（表 10.1）。磷酸钠缓冲液的化学成分可用 $Na_xH_xPO_4$ 来表示，说明该混合液是由单碱盐及二碱盐混合而成的。

配制 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4 与 Na_2HPO_4 的储备溶液，高压灭菌或者过滤灭菌。根据表 10.1 中比例混合两种盐配制特定 pH 值的缓冲液，再加入 90%体积的水稀释溶液到相应浓度。最后校正溶液的 pH 值。通常按照以下方法来微量调节溶液 pH 值：NaH_2PO_4 可降低 pH 值，Na_2HPO_4 可以提高 pH 值。注意：要用稀释到终浓度的磷酸盐溶液来调节 pH 值而不是用 0.2mol/L 的储备溶液来调节 pH 值。最后加水定容。

（2）凝胶与样品制备

① **戴手套！**

② 将琼脂糖溶解于 10mmol/L $Na_xH_yPO_4$（pH7.0）中（终浓度为 1.2%）。

③ 当琼脂糖溶液冷却到 55～60℃时，将其灌注凝固成 12cm×14cm 大小的胶。

注意 溴化乙啶会与乙二醛反应，不能将该染料加到乙二醛凝胶中。同样，SYBR 绿 与 SYBR 金也不能加到胶中。

④ 在无菌的微量离心管中，加入下列物质进行 RNA 样品的变性：

3.7μl RNA（每个泳道最多 10μg）

2.7μl 6mol/L 的乙二醛（去离子的）

8.0μl DMSO（分子生物学纯度）

1.6μl 100mmol/L $Na_xH_yPO_4$，pH7.0

这样比例产生的溶液终浓度为 1mol/L 乙二醛、50% DMSO、10mmol/L $Na_xH_yPO_4$。

⑤ 盖上微量离心管管盖，50℃保温 1h。

⑥ 等凝胶凝固后将其浸入到电泳缓冲液中（10mmol/L $Na_xH_yPO_4$，pH7.0）。将 RNA 样品乙二醛化的同时进行该操作。

注意 要用最少量的电泳缓冲液覆盖琼脂糖凝胶。轻轻地将梳子垂直向上拔出。在拔梳子之前就把

凝胶浸入缓冲液中润滑加样孔，减少梳子拔出时造成的真空。假如没有将缓冲液覆盖在胶上，拔梳子时过大的气压会使加样孔的底部受损。

⑦ 第⑤步保温结束，等样品温度降到20℃后，加入2μl 10×上样缓冲液（50%甘油；1mmol/L EDTA，pH8.0；0.25%溴酚蓝）。微量离心管离心2～3s，将样品集中到管底部。

⑧ 立即上样。

⑨ 电泳时两极之间的最大电压降为5V/cm。当指示剂溴酚蓝移动到80%时可停止电泳。

注意 推测未知分子大小的RNA样品时，就应当电泳到这个位置。在后续的实验中，根据经验估计，只要目的RNA不跑出胶即可。

⑩ 尽管不推荐，但是电泳结束后可直接把凝胶转膜，用于Northern印迹而不需要染色。可用0.5μg/ml的溴化乙锭（溶于100mmol/L的乙酸铵）或2×SYBR绿Ⅱ（溶于1×TBE缓冲液）染凝胶。

注意1 检测者应当考虑到乙二醛与溴化乙锭间的潜在作用会改变它们的光学性质，并降低转移效率。

注意2 也可用30μg/ml吖啶橙（溶于DEPC处理过的10mmol/L磷酸钠，pH7.0）代替溴化乙锭或SYBR绿染料。因为吖啶橙会产生很高的背景，所以这种染色方法也不推荐。使用该方法时可将凝胶放在搪瓷盘（搪瓷能够吸收吖啶橙）中，室温下脱色1h（McMaster和Carmichael，1977）。用热水冲洗搪瓷盘10～15min可以除去吸附的吖啶橙。使用聚丙烯酰胺凝胶时，可以在室温下避光脱色2h或者4℃脱色过夜。吖啶橙也是一种致癌物质，与DNA有结合能力，操作时要小心。

⑪ 乙二醛化的RNA，可以直接从琼脂糖凝胶转移到尼龙膜或硝酸纤维素膜上，不需要脱乙二醛处理。转膜后的预杂交过程中，乙二醛会与RNA样品分离（见第14章）。

注意 不要将凝胶浸泡在碱性溶液中去除乙二醛。碱性环境不仅会降低转移效率，而且会降解RNA，直至杂交可检测水平以下。

10.4 分子量标准

精确测量某种RNA分子的大小，与推测其他大分子物质的分子量有相当的重要性。尽管DNA与RNA都是核酸，但由于内在化学结构的不同，同样长度的RNA分子要比双链DNA分子移动得快[1]。这种差异在甲醛琼脂糖凝胶电泳中很明显（Wicks，1986）。RNA胶中最好不要用常规的λ噬菌体DNA（*Hind* Ⅲ消化）与ΦX174 DNA（*Hae* Ⅲ消化）基因组标准，而是选用RNA分子量标准。只有在乙二醛处理下，RNA与DNA才会有相同的电泳速度（McMaster和Carmichael，1977）；并且只有DNA样品与细胞质内大部分RNA分子的分子量范围相当时，才可以用作分子量标准。

制备RNA电泳的分子量标准并不困难，即使在小型实验室中也很容易实现。以下是估测目的RNA分子量的两种基本方法。

① 外源分子量标准：是可在同一块凝胶上，单独上样的已知分子量的核苷酸分子。这些标准样品基本上都是商品化的。RNA的分子量标准通常含有5～10条体外转录的单链RNA分子。用变性样品的方法来变性这些单链RNA分子量标准。这些分子量标准与样品

[1] 确实有人用双链DNA作为鉴定RNA分子大小的标准，尤其是小于400bp的碱基。

RNA 一样对 RNase 很敏感，操作时应当尽量小心。

在乙二醛系统中，还可以将 4361bp 的 pBR322 质粒三酶切（*Pst* Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Hind* Ⅲ）产物，乙二醛化后作为分子量标准。产物为 779bp、1545bp、2037bp 的三个片段。

② 内源分子量标准：是实验样品中所含的已知分子量大小的 RNA 分子，通常是大亚基 rRNA、小亚基 rRNA。这些分子量标准本身就是样品的一部分，因此在准备电泳样品时就被变性。

许多物种的 rRNA 它们的分子量都是已知的，所以至少可以以它们在凝胶上的位置作为参考。尽管用标准分子量的 RNA 混合物会得到更精确的结果，但是 28S rRNA 与 18S rRNA[1]（单独使用或与 RNA 分子量标准联合使用）几乎是通用的。根据裂解方法的不同，即使是变性恰当的 RNA 样品，电泳后染色也可能显示出具有更大分子量的第 3 个条带。这个较为模糊的条带是 45S rRNA，是 28S rRNA 与 18S rRNA 的核前体（第 2 章，图 2.3），它们聚集在细胞质部分，与过剩的蛋白质相互作用，形成有功能的核糖体。

10.4.1 分子量标准的正确使用

无论是外源还是内源的分子量标准，都可以作为确认样品 RNA 分子量的标准。但两者都有各自的优缺点。对于外源分子量标准要注意以下事项。

① 分子量标准的用量。

② 分子量标准在凝胶中的位置。

③ 分子量标准的大小范围。

④ 分子量标准的观测方法（染色、末端标记还是通过杂交检测）。

几种商标的预制 RNA 分子量标准具有一个特点：体外转录中，合成转录本的 DNA 模板并不是总能完全去除干净。另外，许多模板与常用于分子克隆的质粒载体同源性很低。对于这类载体来源的探针，可能的解决办法只有使用标记的并且用作杂交的不是从载体上切下的核酸探针；或者使用虽然从载体上剪切下来，但两端带有载体序列的探针。虽然工作者很期待探针序列能够有很高的杂交特异性，但载体与分子量标准中残余模板间发生的杂交是不可避免的。因为这种杂交的配对非常好，亚纳克级的模板就足以产生很强的杂交信号[2]。随之带来两个负面影响：①很强的检测信号会覆盖或者模糊相邻条带的杂交信号；②分子量标准泳道中，会出现以前看不到的某些异常的条带，这会给分子量的确定带来很大的麻烦。所以，如果有理由相信，可能产生很强的信号时，明智的做法是，在分子量标准与实验样品的泳道间空一个泳道，并使用纳克级的分子量标准。另外，如果是凝胶染色后检测，每个泳道就需要加入 2μg 的分子量标准，这个量所产生的信号才能拍照。

如果样品中不含载体序列，或者克隆到载体上的探针不与分子量标准中的组分杂交，每个泳道中可以上 4～5μg 的样品量，这样就足以产生拍照存档需要的信号强度。当样品中含有载体序列时，15ng 的分子量标准就可以有效地与互补的载体序列杂交，并检测到非常锐利的条带。

---

[1] 在原核生物中，对应于真核 28S rRNA 与 18S rRNA 的是 23S rRNA 与 16S rRNA。

[2] 假如没有载体序列，或者样品中含有的不是完全相关的载体序列，就不会发生交叉杂交的现象。把 pBR322 相关的载体加到 pBR322 三酶切消化后的产物中会产生很强的杂交信号。

分子量标准的质量，即它在凝胶中的位置，就是一个非常重要的参数。样品通常以不对称方式上样，第一次做电泳实验时更应该如此。得到了明显的条带，但却不知道每个条带代表哪些物质是很令人沮丧的。实验者在转移凝胶时，凝胶被翻转倒置了；转移到滤膜后，无法判断凝胶原来的方向，使实验结果更加复杂化。另外，在 X 射线显影的过程中，翻转胶也有可能会对结果产生影响。假如分子量标准是在凝胶的中央，它两边样品的差异也会不明显。所以不对称上样至少可以消除这些方面的影响。在笔者实验室中，分子量标准通常上在最后一个泳道，也就是说凝胶右上方最后一个（泳道图 10.2）。

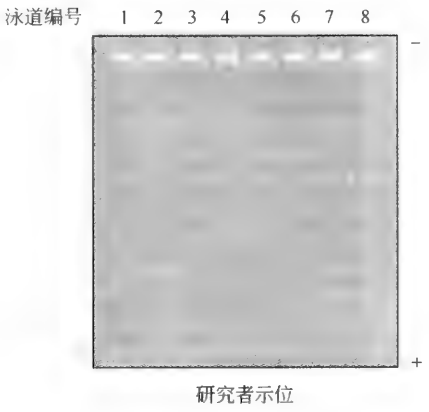


图 10.2　加样的标准方法。
实验者应当在凝胶的正前方加样孔的对面，按照从左到右的顺序依次加样

不同种属的 RNA 分子大小差异很大。需要用一系列跨度很大的已知分子量的 RNA 样品（500～10000bp 是好的起始范围）来判断新系统中 RNA 分子的大小。定出实验样品的大概范围之后，就可以选择非常大的或非常小的分子量标准来精确判断特定种类 RNA 分子的大小。

10.4.2　核糖体 RNA

真核生物的核糖体含有大小亚基两个主要成分。大的称为 60S 亚基，小的称为 40S 亚基；“S”代表 Svedberg 单位，即描述大分子沉降速度的一个生化术语。每个亚基都含有一种特定的 rRNA 以及一组蛋白质。在 RNA 抽提过程中，约有 70 种蛋白质会与 rRNA 分离并被去除，得到的 rRNA 将与其他 RNA 一起被继续纯化。28S rRNA 与 18S rRNA 分别是由 60S 亚基和 40S 亚基去蛋白质产生的。更小的 5S rRNA 和 5.8S rRNA 也是真核生物核糖体的组成成分，在去蛋白质的过程中，它们也会从核糖体内部释放出来。

大量的 rRNA 可作为内参照。

① 可作为分子量标准。

② 可通过目测判断样品的完整性。

③ 为每个泳道中总 RNA 的上样量相同提供证据。可由显像密度计分析或图像分析软件操作得出这些结论。以前的方法可参考 Bonini 和 Hofmann（1991）、Correa-Rotter 等（1992）。

因为 rRNA 是最主要的转录产物（占到总细胞 RNA 的 80%～85%），因此等量的总细胞 RNA 或总细胞质 RNA 电泳后，必然产生明显的、极易观察的两条带，即 28S rRNA 和 18S rRNA。这些条带的存在就可以证实样品的完整性，也就是说样品没有降解。在高等哺乳动物的 RNA 中，28S rRNA 的含量是 18S rRNA 的 2 倍；并不是所有的真核生物都是这样，随着进化等级的降低，这个比例会逐渐趋向于 1（图 10.3）。

除了 28S rRNA 和 18S rRNA 的条带，还应当在两种 rRNA 稍高、之间或稍下的位置，有一条浅的弥散的条带。这是细胞 mRNA 组分的正常现象。其原因是胞质 mRNA 的异源性很高，并且它在总细胞 RNA 中含量不超过 3%。为了达到大分子量 RNA 的最高分辨率，可以延长电泳时间，直至 5S rRNA、5.8S rRNA 和 tRNA 电泳到凝胶的边缘并进入缓冲液。

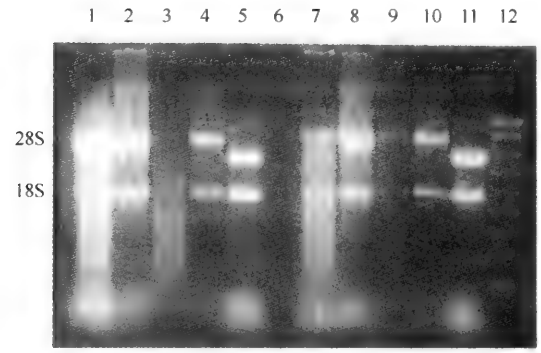


图 10.3 不同种类真核生物 RNA 表达谱的比较。在 1.2%的琼脂糖变性胶上分离纯化的 RNA：CHO-K1 细胞（泳道 1～4 与 7～10）；酵母（*S. uvarum*）的 RNA 样品（泳道 5 和 11）。（泳道 1）非离子溶解法制备的总细胞质 RNA——尽管样品过多，但质量很好。（泳道 2）盐酸胍-酸-苯酚法抽提的总细胞 RNA——质量较好，但有大分子 hnRNA。（泳道 3）poly(A)$^+$ RNA——样品全部降解了。（泳道 4）poly(A)$^-$ RNA——质量很好。（泳道 5）用酸-苯酚法抽提的酵母总 RNA——质量很好。（泳道 6）空白。（泳道 7）非离子溶解法制备的总细胞质 RNA——质量很差，说明样品降解了。（泳道 8）盐酸胍-酸-苯酚法抽提的总细胞 RNA——质量较好，但有大分子 hnRNA。（泳道 9）poly(A)$^+$ RNA——质量很好，注意痕量 28S rRNA 和 18S rRNA，它证实了样品的完整性。（泳道 10）poly(A)$^-$ RNA——质量很好。（泳道 11）用酸-苯酚法抽提的总酵母 RNA——质量很好。（泳道 12）Promega 公司的单链 RNA 分子量标准。从图中可以看出酵母 28S rRNA 移动速度比 CHO-K1 的要快（泳道 5 和 11），泳道 2、4、8、10 中还有 hnRNA 及前体 45S rRNA

因为 5S rRNA、5.8S rRNA 太小，它们经常与 tRNA 一起跑到凝胶的最前端（300～400bp 的范围），所以它们不能作为细胞质 RNA 的分子量标准。因此上述做法是可行的。但这种方法肯定不会被推荐用于评估新的体系。稍后，实验者就可以知道，延长电泳时间能否提高样品的分辨率。

来自绿色组织的植物 RNA，其电泳图谱与动物细胞 RNA 的不同。植物细胞电泳图中除了有大小 rRNA 外，经染色还可以看到大量其他的条带。它们是叶绿体的转录产物（图 10.4）。这些条带的存在是样品完整性的指标。只要在泳道的下半部分有少量或没有弥散的条带，该 RNA 样品在以后的各种应用中可能都会表现良好。虽然传说某些植物的转录产物很稳定，但保存时间超过 6 个月的 RNA 样品最好要进行电泳以确保其完整性。

用 oligo(dT) 纯化的 poly(A)$^+$ RNA 样品，通常都有微量的 rRNA 遗留下来，它们的条带密度能够（比较深时）或不能够（很浅时）判断样品的大小。看到 rRNA 的事实是样品完整性最有力的证据。在回收 poly(A)$^+$ mRNA 时，通常会犯这样的错误，丢弃主要由 rRNA 和 tRNA 组成的 poly(A)$^-$ 组分。若回收该组分并与其他样品一起电泳，其中的 rRNA 可作为合适的分子量标准以及很好的阴性对照。该对照缺少 poly(A)$^+$ mRNA，使得其他泳道中的杂交信号并不是人为的或非特异性杂交的结果。当目的 RNA 位于非常靠近 28S rRNA、18S rRNA 的位置时，这样的对照就特别重要。在作者实验室里，通常按照全细胞 RNA、poly(A)$^-$ RNA 与 poly(A)$^+$ RNA 的顺序来上样电泳（图 10.5）。

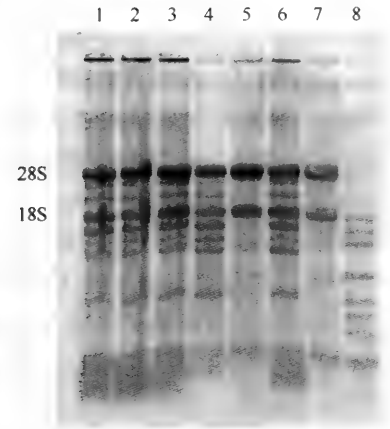


图 10.4　牵牛花（Morning Glory）与番薯植物（*Ipomoea* sp.）总细胞质 RNA 的表达谱。组织中分出的 10μg RNA 样品 50V 电泳 3h。凝胶用 SYBR 金染色 30min。泳道 1：第一叶（诱导后）。泳道 2：第一叶（无性繁殖的）。泳道 3：第一叶（诱导后）。泳道 4：子叶（诱导后）。泳道 5：根部（诱导后）。泳道 6：第一叶（无性繁殖的）。泳道 7：根部（无性繁殖的）。泳道 8：RNA 分子量标准（Promega）。泳道 1～4 和 6 中除了含有 28S rRNA 和 18S rRNA 外，还含有大量的叶绿体转录产物——气生组织，这也是植物 RNA 的共有特征。相比之下，根部的 RNA 样品（泳道 5 和 7）只含有 28S rRNA 和 18S rRNA。值得注意的是这些 RNA 样品已在－80℃保存 16 年，这些高质量 RNA 可以成功地用于转录起始位点的作图研究

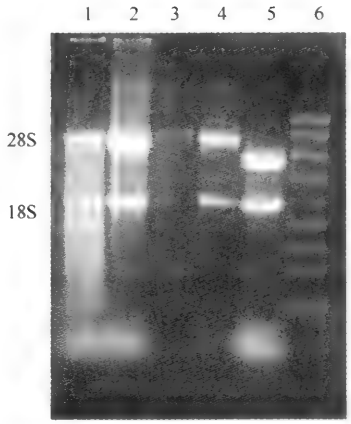


图 10.5　总细胞 RNA、poly(A)$^+$RNA 与 poly(A)$^-$ RNA 的比较。CHO-K1 细胞（泳道 1～4）和酵母（*S. uvarum*；泳道 5）的 RNA 样品在 1.2%的琼脂糖变性胶上电泳。泳道 1：非离子溶解法制备的总细胞质 RNA——质量很差。泳道 2：盐酸胍-酸-苯酚法抽提到的全细胞 RNA——质量好，但有大分子的 hnRNA。泳道 3：poly(A)$^+$ RNA——质量好，含有微量的 rRNA。泳道 4：poly(A)$^-$ RNA——质量好。泳道 5：总酵母 RNA——质量好。泳道 6：RNA 分子量标准（Promega）。酵母 28S rRNA 比哺乳动物的小，因而它的泳动距离比 CHO-K1 的 28S 转录本的大

样品只要稍有降解就不能显示 28S rRNA、18S rRNA 以及稍稍模糊的 mRNA 的这种信号特征。模糊的样品会覆盖略低于完整样品中 18S rRNA 条带位置的整个区域（第 8 章，图 8.1）。偶尔实验者会观测到，一致浓密的雾状物覆盖了整个泳道。在弥散物中，28S rRNA 与 18S rRNA 的条带通常可以看到，虽然在弥散物的后面，但它们似乎处于泳道的正确位置。RNA 样品的条带出现这样的现象有以下三种原因：①RNA 没有很好变性；②样品没有完全溶解于缓冲液；③溶解后的 RNA 样品浓度过高。RNA 样品不能完全变性是最常发生的，样品不完全溶解或者浓度过高也常有可能。特别是当大量纯 RNA 样品沉淀后，没有溶解在足够量的蒸馏水或缓冲液中以配置 5μg/μl 的溶液。或者是少量或中等量的 RNA 样品，风干或旋转蒸发干燥后，却没有重新溶解❶。

另外，可以根据加样孔的特征来检验已加入加样孔的 RNA。加样孔内发出荧光信号，说明样品中含有基因组 DNA。RNA 分离过程中的剪切力使染色体 DNA 成大片段。在电泳过程中，这些大片段不能进入电泳胶。而且，紫外分光光度法不能区分纯的 RNA 样品与

❶ 可以在 65℃加热 15min、加入更多的水、或两者合用，帮助“难以控制的 RNA”溶解。为了维持样品的完整以及成功地用于后续反应，要确保不重复加热样品。无论采用何种途径，明智的做法是，首先用小量 RNA 做预试验，而不是冒险地投入全部样品。

DNA 污染的样品。因而根据 A_{260} 的测量值来进行定量就不准确了，因为基因组 DNA 给样品提供了质量。当凝胶上的行为显示样品纯度不理想时，明智的做法是，在使用有疑问样品进行任何后续实验以前，确定问题的程度，测定剩余样品的质量。如果 DNA 污染是长期的问题，则可用附录 5 中的方法，加 DNase Ⅰ（不含 RNase）保温消化来解决这个问题。就这一点来说，必须清楚，进行一次凝胶电泳，即使是迷你凝胶电泳，也是判断 RNA 样品完整性和实用性的唯一最好的方法。

商品化的分子量标准可以与 rRNA 内部分子量标准联合使用。根据 28S rRNA 与 18S rRNA 的已有知识，需要做的只是测量出它们各自电泳移动的距离。记住划一条直线只需要两个点，就可以做出一条合理的分子量标准曲线。这些工作通常由图像分析软件完成，这些软件能够瞬时测量分析，用宝丽来相机拍摄凝胶照片，或者用摄像机拍摄湿染色凝胶。在任何情况下都需要有照片文档，即使是初步数据。假如没有图像分析软件，则可在胶上放置一个荧光标尺进行测量，必须在每块凝胶上放置标尺。为产生（如 SYBR 绿、SYBR 金、溴化乙锭）图像而使用的紫外线，也可以使荧光标尺出现在照片上（第 5 章，图 5.4）。

核糖体 RNA 分子用作分子量标准，完全是根据文献报道或者以往经验测定所得到的有关 rRNA 的知识。在不知道所研究生物品种 rRNA 的分子量的情况下，进行这种测量是很不明智的。不同生物来源的 rRNA，其分子量的差异非常大，即使在哺乳动物间也是如此，特别是 28S rRNA，而 18S rRNA 间的差异就小得多。总的来说，不同来源的 18S rRNA 间的变化在 1.7～1.9kb 范围内，28S rRNA 的变化在 4.6～5.2kb 之间[1]。作为补充的工具——示踪染料，通常是溴酚蓝，其位置可以作为样品电泳位置的指标。电泳时，溴酚蓝通常在样品的前沿。在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳中，另外一种染料二甲苯青则在 18S rRNA 的后面。由于二甲苯青与 18S rRNA 以及 500～600bp 的聚合酶链反应（PCR）产物共泳动，常常模糊了目的产物条带的荧光，所以本实验室通常不用这种染料。用二甲苯青染料不能带来任何实际的好处，只会增加定量的麻烦，当然不受欢迎。

第一次用 Northern 分析法鉴定样品时，明智的做法是让溴酚蓝走到凝胶全长 3/4 的位置处。这样，在中等大小（12cm×14cm）的凝胶中，RNA 样品就会分离得很好，而且可确保小的目的 RNA 没有跑出凝胶，简化了杂交种属分子大小的精确测定。

测定时，从内源、外源两种分子量标准得出分子量，这就提高了数据的可靠性，特别是目的 RNA 分子过大或过小的时候。基于两个基本原理（这是确实的）。第一，分子在凝胶中的对数分离在整个凝胶长度范围中并不是完全线性化的。过大或者过小的分子不在线性范围内，却仍然根据处于凝胶线性范围内的分子量标准来确定它们的分子量，当然其结果有可能是不准确的。使用多个外源分子量标准时，既可保证至少有一个标准会与目的 RNA 电泳到相近的位置。假如样品 RNA 不在凝胶的线性范围内，那么作为分子量标准的某些分子可能同样电泳出这个线性范围。这样参照得出的分子量差错会比较少。第二，在 Northern 转移的过程中，实验者应当尽量避免样品不稳定转印。例如，凝胶和滤膜中间的气泡，或者凝胶与吸水材料间的气泡，会大大降低气泡附近样品的转移效率。一种模式中，据称几个样品表现出一个目的基因的几种不同调制。事实上，样品的信号调制也有可能是不均匀转移的原因——潜在的目的序列分子仍会留在凝胶中。以下方法可以帮助评估转移效率的高低。

① 印迹结束后，用溴化乙锭、SYBR 绿等再次染凝胶，观测残留的 RNA，尤其是核糖

[1] 人 28S rRNA 和 18S rRNA 的分子质量分别是 5025bp 和 1868bp。

体 RNA（应当没有）。

② 用亚甲基蓝染料可逆性地染滤膜，直接找出 18S rRNA 和 28S rRNA 条带的位置，这样做可以检测转移效率。

③ 假如凝胶是在转移前染色的，而且凝胶中仍然有少量的溴化乙锭或 SYBR 绿染料，并与样品结合，滤膜就可以放在紫外线发射仪上，也可用手提紫外灯从上方低光密度照射滤膜，直接观测滤膜上的 rRNA 样品。

记住，核糖体 RNA 是很好的凝胶加样量对照及转移对照。

最后，也可根据 $\log_{10}$ RNA 分子量对分子从起点（加样孔）泳动到终点的距离作图的方法绘制分子量的校准曲线。这样绘制的曲线，可用来确定凝胶上直接观察到的 RNA 分子的大小，或者也可确定随后的核酸杂交产物的大小。分子量的测定是现在所有图像分析软件和工作站的特色。也可用一对数据、一把直尺和半对数纸，手工绘制合理的校准曲线。

10.5　凝胶染色技术

10.5.1　溴化乙锭

溴化乙锭[1]（EtBr，EB）是一种广泛使用的染料，它使得琼脂糖凝胶上的核酸可以被看到。它是结构上与碘化 propidium 的菲啶嵌入剂。溴化乙锭与 DNA 的结合没有外观上的序列特异性；每 4～5bp，就会与一个溴化乙锭分子结合（Waring，1965）。作为现实的染核酸的替代方法，自 SYBR 绿与 SYBR 金染料出现之后，溴化乙锭就不再是首选的染料了。此外，染料用在哪个步骤也是很有争议的。不仅可以将溴化乙锭加到凝胶中，或者在电泳结束后用溴化乙锭染色；而且可以在上样之前直接把溴化乙锭加到 RNA 样品中，而别的凝胶中不加染料。这样降低了溴化乙锭废弃物产生的数量，而且只有在上样泳道中才会发出荧光信号。简而言之，用不含核酸酶的水配制 1μg/ml 的溴化乙锭储备溶液，取 2μl 的溴化乙锭储备液加到 18μl 热变性的 RNA 样品中，充分混合后就可以上样。

在选择使用溴化乙锭染料前，实验者应当衡量使用溴化乙锭的 4 个主要缺点。

① 溴化乙锭是很强的诱变剂（MacGregor 和 Johnson，1977；Fukunaga 等，1984）。在配制溴化乙锭的储存溶液或稀释液和操作时必须非常小心。因此，污染的缓冲液与实验设备应当作为有毒废弃物处理，溴化乙锭也应该使其失活后按合适的方式丢弃（附录 4；Lunn 和 Sansone，1987，1990）。

② 无论溴化乙锭是加到凝胶中还是上样前加到样品中，都会使核酸的电泳速度降低 15%左右。尽管它不会严重延缓研究者的进程，但也不能以此为理由来增强电泳电压。记住，在较低电压下进行电泳，被证明可以提高凝胶的分辨率。

③ 长期暴露于普通光照下，特别是暴露于紫外线下，会造成 RNA 的缺口，给 RNA 操作带来困难。更有甚者，溴化乙锭的光褪色是非常迅速的，给观察和定量判断增加了困难。

④ 凝胶中的溴化乙锭会降低样品的转移效率。用传统的转移方法，如被动毛细扩散法（第 12 章），会使转移时间的延长变得难以接受。虽然凝胶中即使残存微量的溴化乙锭也会降低转移效率，但将凝胶脱色仍会有助于转移。

---

[1] 在化学上，溴化乙锭是 2,7-二氨基-10-乙基-9-菲啶的溴化物。

将溴化乙锭加到样品中进行电泳的唯一好处在于能够切断电源观测电泳的进度。凝胶置于托盘中后，用紫外线发射器或者手提紫外线光源粗照射就可以直接观察结果（记住对眼睛和皮肤的防护）。假如需要将样品间距离拉得更大，则可以把凝胶放回电泳槽接上电源继续电泳一段时间。

考虑上述因素后仍然选择使用溴化乙锭染料，则下面的建议将会很有用处。

① 接触溴化乙锭污染的溶液、微量注射器枪头等时，应一直戴着手套。在笔者实验室里，将溴化乙锭污染的微量注射器枪头先放进 15ml 的锥形管中，再丢弃到放置有毒废弃物的容器中。

② 通常用水配制 10mg/ml 的溴化乙锭储存液，必须用锡箔纸包裹后 4℃保存。盛有溴化乙锭储备液的微量离心管必须放在小的储存盒中 4℃保存。

③ 在凝胶、电泳缓冲液及染色缓冲液（电泳结束后使用）中的溴化乙锭终浓度不要超过 0.5μg/ml。

④ 只有在电泳完全结束后，仅染色分子量标准的泳道。为了做到这一点，用剃刀片仔细地把分子量标准的泳道直接从整块凝胶上割下来。凝胶染色拍照后，Northern 转印过程中，将分子量标准和其他样品依次排列。这样做的缺点是只有将膜染色才能评估样品的完整性。如果需要，可以把 Northern 转印过程中已印迹有 RNA 的尼龙膜剪开，这样可以增大分子量标准与其他样品间的距离。

⑤ 溴化乙锭的热稳定性很低，所以如果直接将溴化乙锭加到凝胶中使用的话，要等琼脂糖的温度降到 60℃时才能加入溴化乙锭。这种情况下，电泳缓冲液中也应当加溴化乙锭，否则电泳时凝胶下方的溴化乙锭会跑到缓冲液中（图 10.6）。电泳结束后，不要忘记，要正确处理残留的电泳缓冲液。

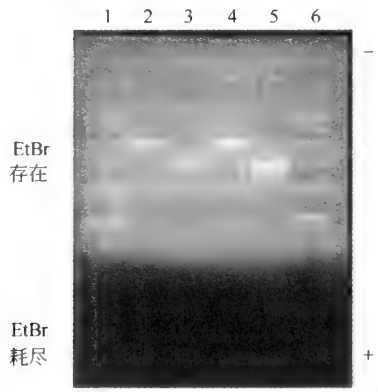


图 10.6 将溴化乙锭（EtBr）直接加入琼脂糖凝胶的影响。当样品向阳极泳动时，溴化乙锭向阴极移动。照片显示了溴化乙锭从凝胶下部移出的影响。电泳继续时间越长，更多的溴化乙锭移出凝胶，如果染料的前沿走过了样品区，将失去某些荧光强度，造成对样品质量的低估。含 500 bp PCR 产物的凝胶（泳道 2 和 4），被剪切成 273 bp 和 227 bp 两个诊断片段（泳道 3 和 5），样品两侧为 PCR 分子量标准（泳道 1 和 6）（Promega）

⑥ 不要在乙二醛凝胶中加入溴化乙锭，因为二者之间会发生反应。

⑦ 单独把溴化乙锭加到样品中而不是加到融化的琼脂糖凝胶中，这样肯定能够降低染料的使用量。然而除非脱色去除凝胶中的溴化乙锭，否则它肯定是转印过程中的障碍。

⑧ 甲醛凝胶中加入溴化乙锭会有很大的麻烦，因为甲醛凝胶用溴化乙锭染色后背景很高。这样的凝胶需要充分脱色，才能观察到 rRNA 的条带。

⑨ 可用染色缓冲液来做凝胶脱色缓冲液，如电泳缓冲液、蒸馏水或 Northern 转印缓冲

液都可以用（如 5×SSPE）。

⑩ 确保染色缓冲液和脱色缓冲液都至少经过高压灭菌除去残余的核糖核酸酶。否则，样品可能会被部分降解。

10.5.2　SYBR 绿

SYBR 绿Ⅰ和 SYBR 绿Ⅱ（分子探针）是广泛使用的新的花青素类核酸染料，它们可分别用于凝胶中 DNA 和 RNA 的可视化。通常可以购买该染料的 10000×DMSO 储存液。临用前，可将其稀释成 1×Tris 缓冲液，也可以稀释成 1×TBE、1×TAE 或者 TE 的缓冲液。不推荐用水稀释 SYBR 绿，因为在 pH8.0 左右的 Tris 缓冲液中才会有最佳的荧光信号。与溴化乙锭不一样，凝胶中存在甲醛对背景没有负面影响，SYBR 绿只有与样品结合后才会发荧光。

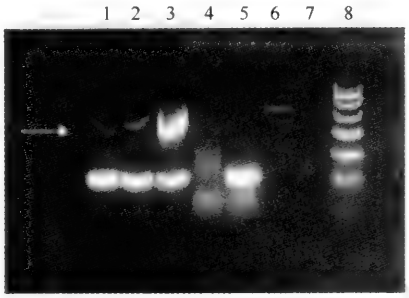


图 10.7　制备凝胶前将 SYBR 绿加入琼脂糖的影响。几乎所有分子量的 DNA 或 RNA 都产生变形的条带，干扰了质量和分子量测定。相反，电泳后用 SYBR 绿或 SYBR 金染胶，获得非常好的染色结果

尽管 SYBR 绿有许多明显的优点（表 10.2），但一定不要把它加到凝胶中。与电泳结束后再染色的条带相比，电泳时样品就含有 SYBR 绿，所有泳道几乎所有分子量的核酸的条带成波浪形、不规则形（图 10.7）。这样就使质量与分子大小的测定变得极其困难。笔者实验室对不同浓度的 SYBR 绿，包括高于或低于推荐浓度的都进行过凝胶内试验，但没有得到满意的结果。虽然在本实验室里，SYBR 绿❶的应用已经非常成功，但也只能在电泳结束后再染色。SYBR 绿与凝胶内的各种酶处理都能兼容，但如需要的话，可以用常规的乙醇沉淀将其去除。

表 10.2　溴化乙锭和 SYBR 染料的比较

项　　目	EB	SYBR
储备液	10mg/ml 水	10000×DMSO
工作浓度	0.5～1.0μg/ml 水	1×Tris 缓冲液(pH7～8)或 1×TAE、1×TBE、TE
与核酸的亲和力	中到高	中到高
直接加入凝胶	可以	必须避免，总是电泳后染色
凝胶的背景	高	低到无
激发光	300nm	300nm
颜色	粉红/橙色	绿色(SYBR 绿)或金色荧光(SYBR 金)
激发诱导染料漂白	是	不是
滤色片	15 号深黄	15 号深黄
检测极限①	5ng(目测)，600pg(CCD 照相机)	60ng DNA(SYBR 绿Ⅰ)，2ng RNA(SYBR 绿Ⅱ)，25pg DNA(SYBR 黄)，1ng RNA(SYBR 黄)
诱变性②	高	比 EB 低，但必须同样小心操作

❶ 蛋白质的相关染料：SYPRO 橙和 SYPRO 红正在取代考马斯亮蓝和银染技术。

续表

项　目	EB	SYBR
废弃物的处置③	活性炭过滤	活性炭过滤
费用	低于中等水平	高于中等水平
染色时间	5～10min	25～30min
对脱色是否有帮助	有	有限

① 外照明可以提高 SYBR 绿的检测极限（Haugland，1996）。用 CCD 照相机或激光成像系统代替黑白照片，也可提高检测极限。

② 虽然 SYBR 绿Ⅰ已经显示其诱变性比 EB 小（Singer 等，1999），但是到本书写作时，SYBR 绿Ⅱ和 SYBR 金的诱变性实验尚未进行。聪明的做法是小心操作所有结合染料的 DNA。假设它们全都有造成伤害的诱变性。

③ 抽提装置（Schleicher 和 Schuell，Cat. No. 448031）是处理大体积 EB（和 SYBR 绿）废弃物的最好和最经济的装置。处理过的滤液可倒入下水道。滤芯根据内部方针处置。详细说明参见附录 4。

10.5.3　SYBR 金

SYBR 金是目前最灵敏的核酸染料。它是一种蓝色素染料，能够用于观察琼脂糖凝胶或者聚丙烯酰胺凝胶中的单链 RNA、双链 RNA、单链 DNA 或双链 DNA，它的灵敏度与银染的灵敏度相当。在笔者实验室中，SYBR 金与标准的 302nm 的紫外发光器或激光扫描装置联合使用。与 SYBR 绿相似，SYBR 金染色后凝胶也没有背景。常规做法是，不同浓度的琼脂糖凝胶都在染液中染色 30min 左右［在柔和的光线下，用旧纸盒盖住胶缓慢振荡（约 50r/min）］。这样染色的 DNA 与 RNA 都为金色荧光条带。与 SYBR 绿一样，SYBR 金也是以 10000×DMSO 储存液提供，使用时可以用 1×Tris 或 1×TAE 或 1×TBE 稀释储存液至 1×使用液。与前面 SYBR 绿部分讲到的相同原因，SYBR 金也不能加到凝胶中使用。为方便起见，适合于 SYBR 绿染色的凝胶的光文件系统，同样可以用来拍 SYBR 金染色的凝胶。

10.5.4　GelStar

GelStar（Cambrex BioScience）是一种能发出荧光信号的核酸染料，与上述的 SYBR 染料相同，与传统的溴化乙锭染料相比它有很多优势。虽然该产物的实验数据说明它可以在电泳前加入凝胶，或者电泳结束后用它染色。但在笔者的实验室，通常都是在电泳结束后再染色。GelStar 可以染色单链或双链的 RNA 和 DNA，而且与同一凝胶用溴化乙锭染色比较，它的灵敏度要高很多。提供的 GelStar 是 DMSO 中 10000×试剂，稀释到 pH7.0～8.5 之间的 Tris 缓冲液中，效果最佳。GelStar 的操作与其他 DNA 染料的操作一样，都要非常小心，而且需通过活性炭滤器排放废弃物（附录 4）。

10.5.5　银染

银染是一种非常灵敏的检测方法。它可以检测聚丙烯酰胺凝胶中少量的蛋白质和小分子核苷酸。一般而言，对很多蛋白质染色时，该方法比考马斯亮蓝的灵敏度高 100 倍；对多核苷酸染色时，它的灵敏度比溴化乙锭的高几倍。它的优点在于不需要特殊仪器就可以直接观察；而且用它染色的凝胶，几乎没有背景。一般不推荐进行琼脂糖凝胶银染，因为在这种凝胶内，它的灵敏度会大大下降。简单地说，用酸固定后，聚丙烯酰胺凝胶就会被可溶性的银离子（Ag^+）覆盖，随后被还原成金属银。只要非可溶性的金属银开始沉积，就会引发更

多金属银自催化聚集，样品的可视化终于出现。厂家提供的试剂盒中，有所有可以直接使用的银染所需试剂。

10.5.6　吖啶橙

使凝胶上核酸分子可视化的一种古老的技术是用一种阳离子型染料吖啶橙（acridine orange）染凝胶（McMaster 和 Carmichael，1977；Carmichael 和 McMaster，1980）。历史上它通常与乙二醛化的 RNA 联合使用，也可作为细胞化学染料（Kasten，1967）。目前它还可以用于细胞周期与凋亡的研究。吖啶橙对核酸的转膜效率的抑制作用没有溴化乙锭强。

吖啶橙能显示两种颜色的光：①它与单链核酸分子的磷酸基团静电结合后，会在 650nm 处发射红色荧光（Bradley 和 Wolf，1959）；②它插入到双螺旋结构的分子中，会在 525nm 处发射绿色荧光（Lerman，1961，1963）。因此在同一块凝胶中，单链核酸分子呈现橘红色，而双链 DNA 分子或未变性 RNA 分子呈现绿色。因为该染料这种特定的多功能性，实验者在进行后续实验前，也可以观察到未变性 RNA 和部分复性 RNA 样品。吖啶橙染色凝胶有很高的背景，需要花费百倍的努力进行不切实际的脱色过程，因而它的应用不是很广泛。

琼脂糖凝胶染色是把胶浸泡于 30μg/ml 吖啶橙的 10mmol/L、pH7.0 磷酸钠缓冲液中 30min。聚丙烯酰胺凝胶也可以浸泡 15min 染色。为了除去吖啶橙染色所产生的过高的背景，把凝胶放在 10mmol/L 的磷酸钠缓冲液中浸泡 1～2h 进行脱色。已有建议，用热水冲洗乙二醛染色的凝胶 20min，可有助于脱色作用。在紫外灯下可以容易地检测到 0.05μg 的双链核酸及 0.1μg 的单链核酸。乙二醛和吖啶橙染色的其他应用另有详述（Broude 和 Budowsky，1971；Carmichael 和 McMaster，1980；Sambrook 和 Russel，2001）。

10.5.7　亚甲基蓝

在过去的 4 年中，亚甲基蓝（methylene blue）广泛应用于某些“低端科技”领域中的琼脂糖凝胶染色。虽然这种染料能够与 DNA 和 RNA 结合，但是凝胶的背景很高，而且亚甲基蓝的灵敏度也非常低。即使经过长时间脱色，因为不能显示出凝胶上的条带，试图用亚甲基蓝对 DNA 或 RNA 进行染色基本上用处不大。在那些禁止使用毒性物质（溴化乙锭或 SYBR）或是觉得它们过于昂贵的中学实验室，适合选用亚甲基蓝。在一个上样孔中上有大量 DNA 样品时，也可以用亚甲基蓝染色。但它仍非主流产品。若干公司都有基于亚甲基蓝的染料出售，的确有很多衍生产品的染色效果比亚甲基蓝好许多，但 SYBR 绿与 SYBR 金的灵敏度是最高的。

1988 年，Herrin 与 Schmidt 报道了一种新的用溴化乙锭或者 SYBR 染凝胶上核酸的技术。该技术把 RNA 样品转印到尼龙或者聚偏二氟乙烯（PVDF）滤膜上，然后在杂交前用亚甲基蓝以可逆方式使核酸染色。该方法有以下的优点。

① 可以直接观察到膜上的 RNA。rRNA 及其他分子量标准在膜上的位置都是一目了然。

② 可在转印后而不是转印前染凝胶，这样可以保证高的转印效率。

③ 印迹之前，凝胶里没有染料（尤其溴化乙锭）会有助于提高转移效率。

④ 亚甲基蓝染料对健康没有潜在的危害，实验结束后的处理工作也比溴化乙锭等染料容易得多。

该技术也有很多不足之处如下。

① 亚甲基蓝染色的背景很高，因而其灵敏度不如其他染料。

② 如果电泳样品已经降解或者其纯度不够，也只有费时费钱地完成转印之后才能知道。

③ 亚甲基蓝染色后就很难将它从滤膜中完全去除。

简单地说，在滤膜染色前，应当用校正过的光源照射，使 RNA 紫外交联到尼龙膜上。也可在染色后将 RNA 印迹到滤膜上。把滤膜放在 pH5.5、0.02%亚甲基蓝、0.3mol/L 乙酸钠的混合液中 3min 后，滤膜上的 RNA 就可直接看到。如果 RNA 样品已经交联于滤膜上，用 1×SSPE 洗涤滤膜 15min 或者用 20%乙醇、80%水的溶液浸泡滤膜 3～5min，就可以很容易地去除多余的染料。如滤膜未经烘烤使 RNA 固定就染色的话，当杂交前用 0.2×SSPE、0.1% SDS 室温下温和洗涤滤膜 15min，并温和地摇动，染料就会直接从 RNA 中洗去。在当前的实验室中，滤膜的亚甲基蓝染色虽然不是很现实，但却是很有趣的方法。

10.6 电泳过程中的安全问题

选择电泳设备时，安全是要考虑的首要问题。电泳进行中或者电源通电后，千万不要碰触凝胶、电泳槽及电源。也绝不要试图改装电泳槽和电源，任何一个差错都会给操作者和实验室其他工作人员带来严重的危害。设计严谨的电泳系统能保证在通电时无法打开电泳槽的盖子。在另一些设计中，在可以接触到电泳槽内壁之前，移开电泳槽盖时，电路就被切断。这样的设计允许在电泳过程中对凝胶进行检查并保证了这一操作的安全性。此后，必须把电泳槽盖放回原处才能使电泳继续进行。当需要离电泳槽很近检查系统时，最好把电泳仪与电泳槽之间的导线取下。最新的电泳仪都配备了两套电泳槽以及相应的导线。只有在电泳槽的两根导线都连接好之后才可以打开电源；试图接上第二套电泳槽前，务必切断电源，接好所有接头之后再打开电源。无论要取下哪段导线，都要先关上电源。最后，千万不要同时接触两根导线，这样可能会构成回路而造成人员触电死亡。

10.7 电泳仪器的维护

电泳是分子生物学实验室的常规操作。一套高质量的电源与电泳槽往往价值几千美元，即使不考虑其危险性，缺乏维护所带来的损失也是让人痛心的。对电泳器械进行基本的预防性维护，其成本不高，而且也符合要求。电泳的所有相关仪器，包括电泳槽与电泳仪的维护，都应严格按照推荐方法进行。

电泳槽与电泳仪的正确使用与维护非常重要，但常被忽视。它们涉及实验室的安全问题。显然操作者应当按程序检查电线、接口以及电极，以防生命危险。所有的电泳仪都应当根据厂家的安全警告与合适的接地插座连接。绝大多数电泳仪都设计为室内使用，所以绝不能潮湿。一旦电源被弄湿，即刻拔下插头，将其完全晾干。并在再次使用前与制造商联系。

最常见的问题可能就是在电源线、电极以及插头处有裸露的铜导线，这可能引发严重的电击事件。制造商或分销商往往提供电源线可供更换，价格也很低廉，因此购买设备时大可多买一些作为备份。另外，实验室内部应每周或每两周一次安排对所有电源线、绝缘体、电

极、连接螺母以及垫片进行常规检查。电泳器械维护的详细方法可参见 Landers（1990）。所有的服务问题应当与专业人员联系。

10.8　第一次进行琼脂糖凝胶电泳时的几点提示

10.8.1　基本术语

灌胶盒（casting tray）：电泳槽中灌制琼脂糖凝胶的那部分。根据体系不同，灌胶盒可以是固定的也可以是移动的。灌胶盒两端必须用胶带或是橡胶垫封住，直至凝胶凝固。

电泳槽（凝胶盒）（gel box）：装有电极，进行电泳分离的部分。

上样缓冲液（loading buffer）：用甘油或蔗糖配置的高密度试剂，电泳前加入样品以提高样品的密度。它可以帮助实验者把样品加到已浸在缓冲液内的凝胶中。上样缓冲液中通常含有可指示电泳行进的有色染料，如溴酚蓝和/或二甲苯蓝。上样缓冲液也可称作样品缓冲液或“蓝果汁”。

电源（power supply）：能够产生恒压维持电泳过程的电子设备。所有样品上样后，盖上安全盖，接通电源与电泳槽，然后将电源的插头插入插座，最后才能打开开关。电源有很大的潜在危害，初次电泳的人应当向经验丰富的同实验室成员学习。

电泳缓冲液（running buffer）：是用来导通电流的电解液，它还可以使浸在其中的胶散热。电泳时电泳缓冲液起缓冲 pH 及离子浓度的作用。

10.8.2　注意事项

① 在配置凝胶时，核糖核酸酶（RNase）可能会污染电泳仪器，特别是梳齿部分。虽然可用某些变性剂抑制核糖核酸酶的活性，但它们会转移到或干扰后续的实验组分。如果没有其他情况，梳子必须被浸泡在 3% 的 H_2O_2 或是 0.5% SDS、50mmol/L EDTA 溶液中，再在使用前用大量的无菌水进行冲洗。不要使用 DEPC 或者 30% 的 H_2O_2，它们不仅对电泳槽有损害，对使用者也可能造成危害。

② 商品化的电泳槽灌胶盒是多种多样的。不少电泳槽的灌胶盒两端都配有橡胶垫，在灌胶时就不再需要封闭灌胶盒两端的缺口（见附录 13，附图 13-1）。不论是什么形式的灌胶盒，灌胶时，都应确保两端已经封闭，这样可以避免漏胶。

③ 用微波炉加热琼脂糖时，要防止过热引起琼脂糖沸腾溢出。沸腾的琼脂糖会引发严重烫伤。把称量好的琼脂粉先在电泳缓冲液中溶解 5～10min，可降低沸腾溢出的可能性。但操作时仍需谨慎，沸腾溢出与意外溢出仍然可能发生。

④ 溶化的琼脂糖是澄清的，在灌胶盒里冷却的过程中会逐步变得不透明。在胶完全凝固之前不要移动灌胶盒。

⑤ 一般灌注厚度为 0.5～0.75cm 的琼脂糖凝胶。为了适应较大体积的样品，可改用梳齿较宽的梳子来增大孔的容积。标准的梳齿大小为 1mm、1.5mm 和 2mm。一旦凝胶厚度超过 0.75cm，样品的转移效率就会降低，需要更长的时间才能使样品充分转移到膜上；此外，对凝胶进行染色与脱色也比较麻烦。

⑥ 灌胶前应确保灌胶盒放置在水平面上。

⑦ 最佳的灌胶方式是在梳齿插入之前，把琼脂糖溶液缓慢而匀速地倒入灌胶盒中部，

直至整个灌胶盒的表面被覆盖时就可以停止，然后立即插上梳子。另外，可以在灌胶盒的侧面做个永久标记来指示应当灌多少的琼脂糖凝胶，这样可以统一整个实验室配置凝胶的方式，也可以保证每次所配凝胶的厚度一致。按照这些步骤的次序，会得到均一的没有气泡的凝胶。假如仍然有气泡，则可用灭菌枪头的尖部把气泡挑出或者赶到边缘。

⑧ 应当在通风橱中配制含有变性剂的琼脂糖凝胶和灌胶，这样可减少接触以及可能带来的健康隐患。

⑨ 应给予充分时间，使凝胶凝固。拔梳齿前把凝胶浸没在电泳缓冲液中，这样可以减少拔梳齿时大气压力造成的影响，降低上样孔底部被破坏的可能性。假如加样孔被破坏却未被察觉，RNA 样品在上样后就可能漏掉。

⑩ 如果拔梳齿时经常会损坏加样孔的底部，可以把凝胶浸没在电泳缓冲液中数分钟，润滑梳齿并使其松动。

⑪ 用最小体积的电泳缓冲液完全覆盖凝胶。因为电流倾向于走电阻最小的路径，也就是说倾向于绕过而非穿过凝胶。所以过多的缓冲液可以降低电泳速度。另外要记得检查边缘处的凝胶，凝胶与盒子的边缘结合处会产生倾斜的截面，如果这些部分没有完全浸没在缓冲液中则不能很好散热，累积的高温效应就会融化部分琼脂糖凝胶。另外，尽量避免在外侧泳道上样，因为凝胶的厚度不均一，外侧泳道样品的迁移率会不一致（边缘效应）。

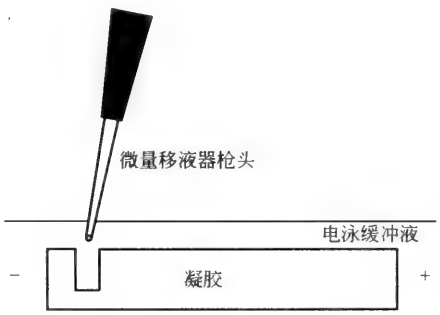


图 10.8　微量移液器枪头将样品加入琼脂糖凝胶上样孔的正确位置

⑫ 尽量减少上样体积。本章中也提到小的上样体积会使 RNA 样品集中在很小的范围，从而增大分辨率。

⑬ 所有的上样缓冲液中，都含有甘油或蔗糖之类的高密度物质，可以增加变性 RNA 样品的密度，使之沉入加样孔。因此，实验者只要穿过加样孔上方的电泳缓冲液，仔细地把样品加到上样孔中就可以了（图 10.8）。可在电泳槽上样孔下方放一张黑纸来缓解液面反射带来的不便。

⑭ 所有上样孔必须使用相同组成的上样缓冲液。也就是说，不混合或不混用不同的上样缓冲液。原因是与其他样品相比，含有高盐的 RNA 样品在凝胶中迁移速度较慢。这也是为什么第 5 章提到的要用大量的 70% 乙醇洗涤 RNA 沉淀的理由。盐会大幅度改变核酸在凝胶中的移动速率（图 10.9）。

⑮ 吸取了样品的枪头，顶部如有空气，在准备将样品加入凝胶的加样孔前，一定要去除空气。避免在加样品前把气体注入加样孔，这会造成样品损失。

⑯ 如果上样时，样品从加样孔中漂起，则表明之前沉淀或者洗涤步骤中的乙醇没有去除干净而被重溶在蒸馏水或 TE 缓冲液中。这就需要重新沉淀样品，70%的乙醇洗涤后充分干燥以除去残留乙醇。只要 RNA 样品中含有稀释了的乙醇，就很难在凝胶上上样。

⑰ 上样后就不要再移动电泳槽的位置，这样会晃动缓冲液，因而会使样品从孔中溢出。

⑱ 所有样品都加完之后，要确保电泳槽的盖子已经盖好，以防发生偶然的触电事故。确定使用的是配套的电泳仪和电泳槽，接上导线，然后再打开电源。按凝胶总长度计算的最

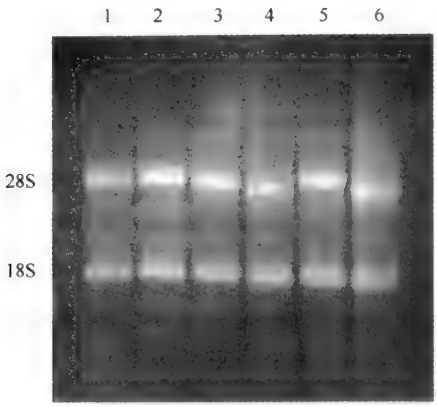


图 10.9　盐对 RNA 电泳的影响。同一批细胞培养物同时分离的几个 RNA 样品在纯化结束时，用不同体积的 70%乙醇洗涤。预期各个样品的 28S rRNA 和 18S rRNA 的迁移率应该一致。但是泳道 4 和 6 的迁移率明显与泳道 1、2、3 和 5 不同，这与其个体离子强度微环境直接相关。只要必要，纯化的 RNA 可以再次沉淀并进一步用 70%乙醇洗涤

大电压为 5V/cm。由于凝胶在电泳槽中的摆放方向并不固定，所以要确保电泳时带有纯负电荷的 RNA 是从负极移向正极。

⑲ 观察凝胶或终止电泳时应先关掉电源再操作电泳槽和电泳仪。另外，一次只能取下一根导线，绝对不能同时操作两根导线。

⑳ 绝不要在电源接通后上样，即使电压很小。很遗憾的是某个实验室的科学家曾经说“在低电压下上样”能够改善她的实验结果。这种危险的操作在任何情况下都不推荐采用。

10.9　参考文献

Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74,** 5350.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R., and Wahl, G. M. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol.* **68,** 220.

Bailey, J. M., and Davidson, N. (1976). Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochem.* **70,** 75.

Bantle, J. A., Maxwell, I. E., and Hahn, W. E. (1976). Specificity of oligo(dT)-cellulose chromatography in the isolation of polyadenylated RNA. *Analytical Biochem.* **72,** 413.

Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12,** 721.

Boedtker, H. (1971). Conformation independent molecular weight determinations of RNA by gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **240,** 448.

Bonini, J. A., and Hofmann, C. (1991). A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *BioTechniques* **11,** 708.

Bradley, D. F., and Wolf, M. K. (1959). Aggregation of dyes bound to polyanions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45,** 944.

Broude, N. E., and Budowsky, E. I. (1971). The reaction of glyoxal with nucleic acid components III. Kinetics of the reaction with monomers. *Biochim. Biophys. Acta* **254,** 380.

Carmichael, G. G., and McMaster, G. K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Meth. Enzymol.* **65,** 380.

Church G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81,** 1991.

Correa-Rotter, R., Mariash, C. N., and Rosenberg, M. E. (1992). Loading and transfer control for northern hybridization. *BioTechniques* **12,** 154.

Farrell, R. E., Jr., and Greene, J. J. (1992). Regulation of *c-myc* and *c-Ha-ras* oncogene expression by cell shape. *J. Cell. Physiol.* **153,** 429.

Favaloro, J. R., Triesman, R., and Kamen, R. (1980). Transcriptional maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods Enzymol.* **65,** 718.

Fornace, A. J., and Mitchell, J. (1986). Induction of B2 RNA polymerase III transcription by heat shock: Enrichment for heat shock induced sequences in rodent cells by hybridization subtraction. *Nucleic Acids Res.* **14,** 5793.

Fukunaga, M., Cox, B. A., von Sprecken, R. S., and Yielding, L. W. (1984). Production of frameshift mutations in Salmonella by phenanthridinium derivatives: Enzymatic activation and photoaffinity labeling. *Mutat. Res.* **127**, 31.

Gruenwedel, D. W., and Davidson, N. (1966). Complexing and denaturation of DNA by methylmercuric hydroxide. I. Spectrophotometric studies. *J. Mol. Biol.* **21,** 129.

Haugland, R. P. (1996). "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals," 6th ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.

Herrin, D. L., and Schmidt, G. W. (1988). Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization. *BioTechniques* **6,** 196.

Hollander, M. C., and Fornace, A. J., Jr. (1990). Estimation of relative mRNA content by filter hybridization to a polythymidylate probe. *BioTechniques* **9,** 174.

Hutton, J. R., and Wetmur, J. G. (1973). Effect of chemical modification on the rate of renaturation of deoxyribonucleic acid. Deaminated and glyoxalated deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **12,** 558.

Johnson, D. (1975). A new method of DNA denaturation mapping. *Nucleic Acids Res.* **2,** 2049.

Junghans, R. P. (1983). A review of the toxicity of methyl mercury compounds with application to occupational exposures associated with laboratory uses. *Environ. Res.* **31,** 1.

Kasten, F. H. (1967). Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Int. Rev. Cytol.* **21,** 141.

Landers, T. (1990). Electrophoresis apparatus maintenance. *Focus* **12(2),** 54.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* **16,** 4743.

Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **3,** 18.

Lerman L. S. (1963). The structure of the DNA-acridine complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49,** 94.

Lewin, B. (Ed.). (2004). "Genes VIII." Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

Lunn, G., and Sansone, E. B. (1987). Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions. *Analytical Biochem.* **162,** 453.

Lunn, G., and Sansone, E. B. (1990). Degradation of ethidium bromide in alcohols. *BioTechniques* **8,** 372.

MacGregor, J. R., and Johnson, I. J. (1977). *In vitro* metabolic activation of ethidium bromide and other phenanthridinium compounds: Mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **48,** 103.

Maniatis, T., Jeffrey, A., and Kleid, D. G. (1975). Nucleotide sequence of the rightward operator of the phage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72,** 1184.

McMaster, G. K., and Carmichael, G. C. (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74,** 4835.

Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nuc. Acids Res.* **7,** 1175.

Nakaya, K., Takenaka, O., Horinishi, H., and Shibata, K. (1968). Reactions of glyoxal with nucleic acids, nucleotides and their component bases. *Biochim. Biophys. Acta* **161,** 23.

Rave, N., Crkvenjakov, N., and Boedtker, H. (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl-paper from formaldehyde gels. *Nucleic Acids Res.* **6,** 3559.

Reijnders, L., Sloof, P., Siral, J., and Borst, P. (1973). Gel electrophoresis of RNA under denaturing conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **324,** 320.

Salomaa, P. (1956). Two volumetric methods for the determination of glyoxal. *Acta Chem. Scand.* **10,** 306.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (Eds.). (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shapiro, R. Cohen, B. I., and Clagett, D. C. (1970). Specific acylation of the guanine residues of ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **245,** 2633.

Sharp, P. A., Berk, A. J., and Berget, S. M. (1980). Transcriptional maps of adenovirus. *Methods Enzymol.* **65,** 750.

Singer, V. L., Lawlor, T. E., and Yue, S. (1999). Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat. Res.* **439,** 37.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98,** 503.

Spohr, G., Mirault, M. E., Imaizumi, T., and Scherrer, K. (1976). Molecular-weight determination of animal-cell RNA by electrophoresis in formamide under fully denaturing conditions on exponential polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **62,** 313.

Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77,** 5201.

Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **13,** 269.

Wicks, R. J. (1986). RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: Comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int. J. Biochem.* **18,** 277.

Zinn, K., DeMaio, D., and Maniatis, T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β-interferon gene. *Cell* **34,** 865.

（金言　邹亚娟译；金由辛校）

第 11 章　照片文档和图像分析

11.1　基本原理

精确地保存实验记录和结论数据是非常必要的。电泳凝胶包含了对实验结果做出精确解释的关键信息，这些数据常常暗示了后续实验应如何去做，后续实验可以对所做的科学试验作什么更深入的解释。电泳获得的信息对实验的分析和对后续实验的设计都是非常有价值的。然而，凝胶只能保存很短的时间，并且用来显示核酸的染料甚至会扩散得更快。这就要求用照相的方法来记录电泳结果，以及记录任何通过杂交获得的 X 射线胶片的结果（通过化学发光和放射自显影法）。为了稳定地长时间保存数据以便于进一步分析、做小范围的介绍或发表在杂志上，照相法是唯一可行的方法。

在分子生物学研究中，为了记录并分析各种类型的图像，很多不同类型的图像分析系统已经应用并得到广泛认可。这些系统主要可以分为两大类：①在热敏纸或胶片（人造偏振片）上显影的传统照片；②数字图像，凝胶或 X 射线的数字图像中，所包含的信息的分析和储存依赖电脑和/或磁盘。这两种方法各有优缺点，将在后文中进行介绍。截止到写这本书的时候，大多数分子生物学实验室都装备了至少一种数字成像分析系统。尖端的图像分析系统价值成千上万美元。大多数普通实验室，都可以通过在凝胶上方简单装备数码相机和合适的图像滤光片以及对使用者适当的防护装置，来获得电子照片文档。

11.2　照片文档

传统意义上说的照片文件，是指研究者在凝胶电泳并染色以后人工获得的图像。过去，这通常是通过宝丽来（Polaroid）即时成像产品实现的。传统的照片文档系统，主要有广泛运用的宝丽来 DS-34 手提式照相机（图 11.1）和老式的宝丽来 MP-4＋多功能系统。实践证明，DS-34 系统成本低廉且用途广泛。无论用这两种设备中的哪一种，研究者都能获得凝胶的图像，将图像贴到实验记录本上，然后给图像加上合适的注释。与宝丽来即时成像系统相比，新式设备已经开发出来并装备到了大多数实验室。新式的数字成像系统通常会配备打印设备，使研究人员可以获得一份完整的纸质图像。通过这些系统，照片进行了数字化，而且照片可以打印在纸上，如老式的传真纸一样的热敏纸，或者通过激光打印机打印在普通纸上。在早期，尽管经过了许多改进，热敏印刷仍然缺少足够的清晰度。现在，很多实验室都使用高光泽度的热敏纸来保存有用的电泳图像。尽管需要相当的预先投资，但是这些图像系

统能够在操作时提供更快的速度，并使处理数据的效率提高，或者以 *.tif 的格式作为 e-mail 附件发送出去，或者直接将图像导入 Word 文档，以便于与远程交流合作。宝丽来照片也能够根据需要进行扫描、数字化、分析、分类以及归档。并且传统的照片比打印在热敏纸上的照片有更长的寿命。不管选用哪种方法打印，每个图像在实验记录本上的备份都是最为重要的。电脑是很便利的，但是也会经常出问题。因此对电泳图像的拷贝存储，并打印出一张图像，也是非常必要的。此外，从节省时间的角度看，打开实验记录本看一副图像，无论如何都比完成如下这些步骤要快捷方便得多。①等待打开电脑；②登录进入操作系统；③打开一个处理图像的软件；④找到图像储存的位置；⑤如果需要的话，打印出一幅图像。

图 11.1　宝丽来 DS-34 手提式照相机。遮光罩可适合各种大小的凝胶，并使照相机迅速聚焦。内置镜片保证准确的放大倍数和焦点距离

实际教训：图像分析软件是一个非常有效并且节省时间的工具，但是保存一份凝胶图像的硬拷贝复印件也同样是很重要的。在实验室中，数字图像不仅要保存并归档到电脑硬盘上，而且应该在生成图像的当天就打印出一份复印件贴在实验记录中。

11.2.1　样本可视化

传统的通过标准宝丽来胶片获得的黑白或彩色的图像，有些是有底片的，有些是没有底片的。现在，实验室可以通过使用一个 CCD（电荷耦联设备）照相机直接从湿润的凝胶上捕获视频图像，也可以使用像 STORM 860 荧光成像仪（Amersham Biosciences）这样的激光扫描仪来扫描以前生成的图像。为了显示出核酸，凝胶可以使用 SYBR 绿、SYBR 金、溴化乙锭等染料染色，然后将凝胶放置到紫外激发光上，就可以照相（图 11.2）或者通过扫描获得图像。在有些情况下，反射照明（也就是紫外激发光从凝胶的上方照下）可以提高显像的灵敏度。DNA 或 RNA 在凝胶中的分布，通过数字图像捕获系统或只是简单地按下宝丽来照相机上的快门记录下来。然后，通过对图像进行分析，得出核酸的量、分子量以及胶上条带的相对丰度和比率。数字成像系统一般为手动聚焦并且包含缩放功能，使研究者能够将整个凝胶的图像显示出来，或者只是选取凝胶上感兴趣的某些位置成像。宝丽来成像系统能够使用不同的胶片，并且有一个遮光罩能够调整以便从多个角度拍照。这就更容易使照相机维持在正确的焦距，并获得清晰的电泳图。

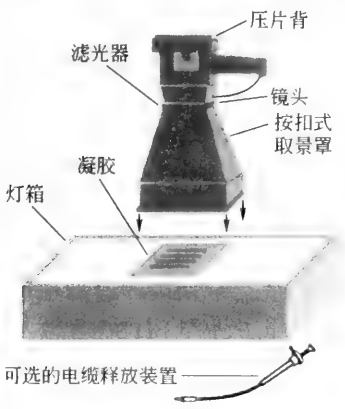


图 11.2　凝胶下方的紫外线允许直接检查凝胶上的核酸。该照相机也适合拍摄平稳放置、紫外光上方照射的凝胶。多美妙的宝丽来照相机

所有的图像分析系统都能够调节快门速度和光圈大小以控制曝光量。如果使用者不能确定系统的参数是否正确，开始时可以使用在 $f/8$ 光圈下曝光 0.5s 来获得 EB 染色凝胶的图像，如果需要的话可以再进行修正。对于 SYBR 绿和 SYBR 金染色的凝胶，则可以选择用

0.5s 快门和 $f/5.6$ 光圈拍照。当然，拍照条件的设定主要还是依靠经验，并且与核酸的分子量、染色时间、脱色、背景荧光的大小以及是紫外线上方照射还是紫外线下方照射等诸多因素直接相关。多数图像分析系统具有图像整合功能，这种功能能够提高对低亮度条带的灵敏度。在获得图像的同时就可以整合图像，然后根据操作者的需要，进行多层图像的整合。为了更好地理解整合的概念，先在低光照条件下获得一张图像（这种条件下图像的许多细节都难以捕获），同时获得该图像无数透明的层次；然后将这些透明的层次，一层层叠放到最初的图像上，这就是整合。通过这种方法，图像中原本模糊的细节就可以变得清晰。操作者可以不停叠加新的透明层直至得到足够清晰的图像。尽管这是提高图像效果的一个很好的方法，但是随着不断叠加新的透明层，图像的背景也会加深。所以，整合是一个很有用的方法，但必须适度使用。

笔者经过多次观察，发现一个经常犯的错误：将两个具有不同整合度的不同图像直接进行比较，然后得出分布在两个不同凝胶上 PCR 产物的相对丰度。如果一个图像进行了 20 层的整合，而另一个图像只进行了 5 层的整合，那么两块胶之间直接相互比较是完全错误的。只有在同一块胶上的电泳条带才可以直接互相对比，以定量或标准化。用分子量标记，分别将每块胶上的条带标准化，然后相互比较是一种常用于不同胶上的条带之间相互比较的方法，但是可信度不如同一块胶上的条带比较。

11.2.2 色彩过滤

除非条带在凝胶图像上非常明显，否则图像不能传达详细的有用信息。因为多数的电泳照片都是黑白胶片或灰度图像分析，所以适当的对照是很必要的。然而需要注意的是，SYBR 绿或 SYBR 金染色的彩色电泳图像是非常好的。在忽略照相镜头或使用的胶片差异时，色彩过滤能够提高细节，并使得电泳条带更加清晰锐利。

滤色器能够吸收和它互补的颜色并传递它自身的颜色，操作者可以调控图像中色彩的相对亮度以显示类似黑白照片的图像。比如，红色的滤色器会使蓝色和绿色变暗，而使红色变得相对明亮。下面举了一个有效的方法，记忆颜色之间的互补性以及如何选择正确的滤色器。

“Red Cadillac by General Motors”（通用汽车公司生产红色的卡迪拉克）

更确切地说：

Red Cadillac：Red and Cyan（红色和青色）

by：Blue and Yellow（蓝色和黄色）

General Motors：Green and Magenta（绿色和洋红色）

表 11.1 列出了常用的一些核酸和蛋白质凝胶电泳染料[1]，相对应地能得到最好效果的滤色器以及合适的光圈和快门速度。因为滤色器吸光，故有必要确保对凝胶进行合适的光照。也就是说，使用单一形式的下光源照射。透射仪中烧坏的紫外灯泡需要专业人员尽快更换。在某些情况下，操作者可能需要增加曝光时间或使用更大的光圈或两者同时增加来补偿由滤色器产生的影响。此外，由于紫外线光源[2]输出的是比较低亮度的光，所以高速胶片相当适合这种照明下的拍摄。在每次不同的运用中，需要根据经验进行调节以获得精确的参数。

---

[1] 针对吖啶橙染料和彩色照片，使用 108 型宝丽来彩色胶片和黄色滤色器；针对黑白照片，使用 105 型或 107 型宝丽来胶片和红色滤色器。

[2] 注意：尽管 UV 光源发出的光一般比较弱，但是如果没有保护措施的话，它发出的短波辐射和中波辐射能够快速导致没有保护的眼睛和皮肤的永久性损伤。操作时一定要戴 UV 级的保护眼镜，并避免皮肤暴露在紫外线下。

表 11.1　常见的电泳染料和对应的滤色器

光源(波长)	染　料	滤　色　器	光　圈	快门速度③/s
UV②(302nm)	溴化乙锭	22 号深橙色或 15 号深黄	$f/8$	1/4
UV(302nm)	SYBR 绿,SYBR 金	15 号深黄	$f/5.6$	1/2
内置白光照明(254nm)	SYBR 绿,SYBR 金	15 号深黄	$f/5.6$	1/2
白光(400～700nm)	考马斯亮蓝	8 号中黄或 9 号深黄	$f/16$	1/30
白光(400～700nm)	ELISA①	8 号中黄	$f/16$	1/30
白光(400～700nm)	银染	58 号绿	$f/16$	1/30

① ELISA—酶联免疫吸附测定法。

② UV—紫外线。

③ 根据宝丽来 667 型和 57 型胶片（ISO 3000）。如果使用低感光度胶片，则需要更长的曝光时间或更大的光圈。尽管是否需要整合以及整合的有效性依赖于经验，电子影片捕获设备也同样使用了滤光装置。

11.2.3　安全第一

紫外线透射仪（UV transilluminator）和手持紫外灯都是危险的强紫外辐射源。暴露在这些实验仪器的紫外灯（通常发射出 302nm 或 312nm 的紫外线，有时候也有 254nm 或其他紫外波长的紫外线）照射下，会对眼角膜、视网膜以及眼睛的其他结构和皮肤造成严重的伤害。因为这种伤害是可积累的，因此，不管是从短期还是长期来看，少量的紫外灯照射就能带来灾难性的后果。必须确保每次操作都戴上手套、眼罩或面罩，即使是在使用有保护罩的紫外线透射仪时，也是如此。因为尽管紫外线透射仪的保护罩通常情况下能够阻挡多数的紫外线照射，但同时也会有少量的紫外线透过。而且，裂缝、摆放不适当和遮光罩挡不住的部分，都会使紫外线照射到人体，造成潜在的健康和安全隐患。

当凝胶铺在紫外线透射仪上拍照时，凝胶通常会完全笼罩在手持照相机的遮光罩下面。紫外灯应该在照相之前迅速打开，并在拍好照片之后迅速关闭，甚至是要在曝光的胶片从照相机中取出前就要关闭紫外灯。因为经常会忘记关闭紫外灯，这样操作者和同实验室的其他人员就会长时间暴露在紫外线照射下造成伤害。这种事情经常发生，尤其是在室内的灯开着的时候。无论透射仪表面暴露部分面积多小，都会给操作者带来很大的伤害。所以要时刻保证在整个透射仪的表面覆盖保护罩。另外，透射仪表面也会在短时间内很快变热，所以也应适当保护。还需要注意的是，并不是所有安全玻璃挡板都是可防紫外等级的，因此无论出于什么目的使用紫外透射仪，无论使用多长时间，使用合适的安全防护设备都是非常必要的。最后，应当避免与带有染料的凝胶直接接触。因为能够与 DNA 或 RNA 结合的染料通常都有明显的导致基因突变的能力。在获得照片文件的同时，不能错误估计或低估了这个过程中所潜在的危险因素。

幸运的是，现在出售的多数图像分析工作站都有相关的设计，以保证紫外线透射仪完全内置于工作站内，并且在遮光门没有完全关闭的情况下，紫外灯也不会打开。这种巧妙的设计，避免了紫外线直接对操作者的照射。

11.2.4　优化电泳图的一些小技巧

① 图像尺寸最大化。在使用 DS-34 照相机时，一定确保选择与凝胶大小最为接近的遮光罩。如果使用大的遮光罩（如 15cm×15cm）拍摄比较小的胶（如 7cm×8cm），得到的图

像就会在整张照片中间只有邮票一般大小，而周围都是空的背景。一个与凝胶大小合适的照片，可以在灵敏度和分辨率等各方面都提供最好的细节。为便于图像分析，可以将目的条带放大到最好的分辨率。

② 使用紫外灯时选择光敏感程度高的胶片。只要有可能，就使用 ISO 3000 的胶片，如宝丽来 667 型和 57 型胶片，这两种胶片都适用于大多数常规的应用。高感光度的胶片能够得到更加锐利的条带，可以使用更短的曝光时间进行曝光。这同时也可以让使用旧式紫外成像系统的操作者更少地暴露在紫外灯下以减少伤害。对于溴化乙锭染色的凝胶，在紫外灯照射下会比较快褪去荧光颜色，所以更短的曝光时间还有利于获得更多的凝胶图像。更短的曝光时间还能避免凝胶中 DNA 或 RNA 由于长时间紫外照射导致的磷酸二酯键的断裂。如果凝胶中的条带需要回收做克隆或进一步操作的话，这个因素就非常需要注意了。即使少量的紫外照射也会导致 DNA 或 RNA 磷酸二酯键的断裂，所以要确保有足够的量用于 Northern 或 Southern 转膜。过多的断裂将会导致无法进行接下来的核酸杂交等步骤。

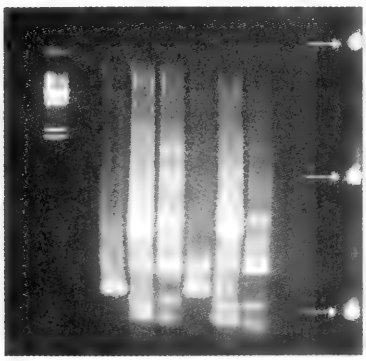


图 11.3　宝丽来相机脏滚轴的影响。注意照片最右端边缘的三个很大的白点

③ 保持照相机滚轴的清洁。为了避免图像上有污点或其他操作过程中产生的缺陷，需要使用温水和棉签或擦镜纸（Kimwipes）定期清洁 DS-34 照相机滚轴。当照片上出现了三个或四个污点甚至成片的污点时，清洗滚轴就非常必要了（图 11.3）。这些污点一般是当胶片从照相机中取出时，用力不平导致在滚轴上产生残留碎片造成的。

④ 保持紫外线透射仪表面的清洁。拍完照片后凝胶应该立即从透射仪表面移走。如果不立刻移走的话，经常会把胶遗忘在那里很长时间。这样凝胶就会变干，并且粘在透射仪的表面。另外，遗留在透射仪上干胶内的溴化乙锭或其他荧光燃料，在以后拍照时会产生背景污点。最好能够在每次使用后，使用棉签蘸上去离子水或 70%酒精清洗透射仪的表面，并立即使用擦镜纸擦干。在拍摄凝胶图像时，没有什么比干净的背景更重要了。

⑤ 按照胶片显影指导的条件进行显影。要密切注意每种不同类型胶片推荐使用的显影程序、调试时间和温度。胶片显影不足或过度显影都是经常出现的问题。并且通常会导致图像质量的下降。总的来说，最常用的黑白胶片需要在从相机中取出后显影 30s。过度显影将会提高图像的对比度，这种影响是好是坏主要取决于凝胶上各个不同条带的深浅。当对比度增加的时候，最亮的条带会更加突出（图 11.4）。然而，最弱的条带则会更弱，甚至变得和背景相同以至于观察者看不出相应的条带。

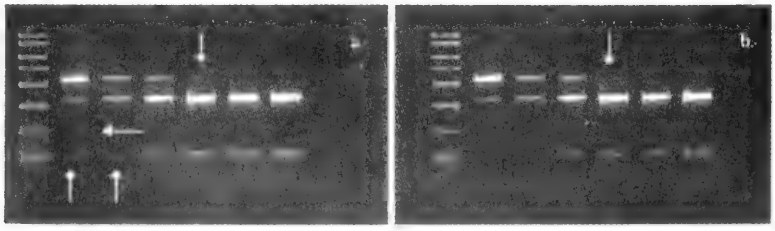


图 11.4　过度显影的宝丽来电泳图。a. 正确的显影时间；b. 过度显影导致低亮度条带的缺失

⑥ 数码相机设置的标准化。为了保持一致性，需要特别注意光圈大小、整合层数以及快门速度的设定。在同一个实验室，这些设定需要保持一致性，这样一些不同实验的图像之间相互对比才有意义。

⑦ 避免极端温度。宝丽来胶片理想的显影温度是室温，一般 21～24℃。如果实验室温度偏高或偏低，或胶片在使用前在冰箱中冷藏，那么就有必要对显影时间或曝光时间做适当的调整。按胶片的使用说明调整。

⑧ 使用比较小的光圈。较小的光圈可以获得较大的景深，并且获得的图像更加锐利。理论上说，应该从 $f/16$ 的小光圈开始调节，逐渐增大光圈直到最合适大小。通常情况下，溴化乙锭染色的凝胶，需要在 $f/8$ 大小的光圈下曝光 1/4s，获取合适的图像；而 SYBR 染色的凝胶，则在 $f/5.6$ 大小的光圈下曝光 1/4s 或 1/2s，根据需要而定。

⑨ 尽量减少相机的抖动。在使用感光度低的胶卷获取溴化乙锭染色，尤其是 SYBR 绿或 SYBR 金染色的凝胶图像时，常需要较长的曝光时间。为了尽量减少相机的抖动，一般使用快门释放绳代替手枪握把式的快门释放按钮，这对于手提式 DS-34 相机是很容易更换的。当然使用感光度高的胶片更好（参见第②条）。对于图像分析工作站来说，相机的抖动通常不需要考虑。

⑩ 排除环境光源的干扰。如果使用的是手提照相机，一定要确保照相机的遮光罩直接放置在光盒上，这样可以避免背景光到达感光胶片。在使用这种照相机时，通常不需要关闭房间内的光源。但是，必须保证在获得凝胶图像后立刻关闭紫外线透射仪。如果使用的是图像分析工作站，大多数情况下，紫外线透射仪在安全门没有完全关闭并且紧锁的时候，是不会打开的。这保护操作者避免遭到紫外线的照射，同时也避免了环境光源对感光胶片的干扰。

⑪ 使用正确的滤色器。将滤色器作为照片文件系统的一个组成部分。对颜色的过滤，能够增加电泳图像的对比度。理想情况下，操作者应该尽可能使用旋入式的玻璃滤色器。有时候，醋酸盐滤色器会扭曲光路，因此应当尽量避免使用。

⑫ 避免弄模糊镜头。注意透射仪打开的总时间。因为透射仪的表面会在打开后短时间内变热，凝胶内的液体就会挥发，然后聚集在照相机遮光罩或图像分析工作站内的镜头上。这就使得镜头上蒙上一层雾，严重影响获得照片的质量。使用擦镜纸擦干镜头，可以轻易地避免这种情况的发生。

⑬ 正确地获取胶片。曝光好的照片直接从照相机中取出，取出的时候动作要慢，并且要平缓地从垂直于操作者的方向取出，而不能向上或向下从照相机中取出胶片。建议操作者以“Pol-ar-oid”的节奏将胶片取出。到了推荐的显影时间，将胶片夹翻转，抓住胶片上印有数字的角，将胶片从充满显影剂的胶片夹上拉下。包括 667 型在内的一些胶片，不需要任何类型的涂层，胶片一开始有可能会轻微拱起，但 4～5min 之内就会变平。不要触摸底片或者底片依附的薄片，因为这两者都含有皮肤不应接触的碱类物质。

最后，对于新手来说，需要熟记以下两点。

① 镜头上标有“B、1、2、4、8、16、32 和 64”等代表快门速度的刻度。“B”门表示只要操作者按着快门不松手，就会一直曝光。数字则代表快门速度的倒数（如 2 代表 1/2s，4 则代表 1/4s）。

② 术语光圈设定和 $f/$stop 两者是可以互换的。它们表示镜头快门张开的大小。显然，这个参数是指能够进入镜头并且使胶片曝光的进光量的多少。$f/$stop 刻度标的数字，与快

门刻度一样也是相反的。也就是说数字越小，表示光圈越大。

11.2.5 照相技术和 X 射线胶片固有的局限性

照相系统中，记录图像的方法是一种能量转换的过程。它利用卤化银晶体对光子的敏感性来记录光源或物体发射和反射光子的水平。当光子的能量水平足够时，卤化银晶体吸收光子后，变形形成潜在的图像位置。在这个位置，晶体中银和卤素之间的化学键断裂，产生自由卤素和金属银。如果在短时间内卤化银接受的光子能量太多，卤化银晶体将没有足够的反应速度来正确记录这一事件。同样，如果卤化银晶体在长时间内接受的光子能量太少，那么此时卤化银的反应和在正常情况下的反应也不同，也不能正确记录事件。

在某个临界点，晶体接受足够的能量可以使胶片上的金属银达到饱和。超过这一临界点的曝光量就不能再记录信息，从而使特征性的图像保持在同一曝光水平上。对宝丽来胶片而言，这种饱和水平与被称作 D-Min 的最低密度相关。当晶体达到对光子能量如此低的吸收水平时，它将不能够生成潜在的图像，就像胶片上从没有吸收到光子能量一样，这就产生了对最大密度也就是 D-Max 的统一反映。在 D-Min 和 D-Max 之间的范围，银晶体能够以非线性的方式记录高光和阴影的细节。因为这个范围内晶体接近线性变化以记录对能量的吸收。胶片能够对高光和阴影区域进行有效记录的范围称为胶片的动态范围。尽管理想状态下，人们希望胶片和光子源有相同的范围，这样系统就能够记录逼真的图像。但是通常情况下，光子范围要大于胶片的动态范围。在这种情况下，图像系统的操作者就必须选择哪个范围是最为重要的。操作者通过调整系统的曝光，决定要记录图片的范围，同时也会损失掉胶片动态范围以外的高光和阴影部分。在分子生物学实验室，最强的和最弱的条带常常都需要显示在图像上，这时可以使用不同光圈值对同一块胶曝光 2～3 次，以获得一张图像上尽可能多的有用数据。

11.3 数字图像分析

有许多传统的用来解读凝胶电泳图像（电泳图）的方法，现在都已经不再使用，如视觉观察和密度计量学方法。有很多计算机软、硬件能够快速、可重复地进行图像分析。很多测量方法都已实现自动化，包括测算分子量、浓度、相对丰度和综合光密度（IOD）等。同时计算机还可以作为分类存储图像的手段。图像分析系统通常是一个完整的设备齐全的系统。FOTO/Analyst Archiver Eclipse 工作站（图 11.5）就是一个很好的例子。图像分析软件则可以单独购买并且使用在已有的仪器上。在所有的图像分析软件中，Gel-Pro 分析器（Media Cybernetics）是杰出的代表（图 11.6）。这个软件使用简单的操作即得到想要的信息，而不需要使用者有很高的电脑水平。该软件还有自动化识别泳道、寻找条带以及操作者自定义宏等诸多功能。尽管操作需要有限的输入，但是可以完全不要去管所有的自动化功能，计算机有很大的机动性。

图 11.5 FOTO/Analyst Archiver Eclipse 工作站。FOTODYNE 授权（www.fotodyne.com）

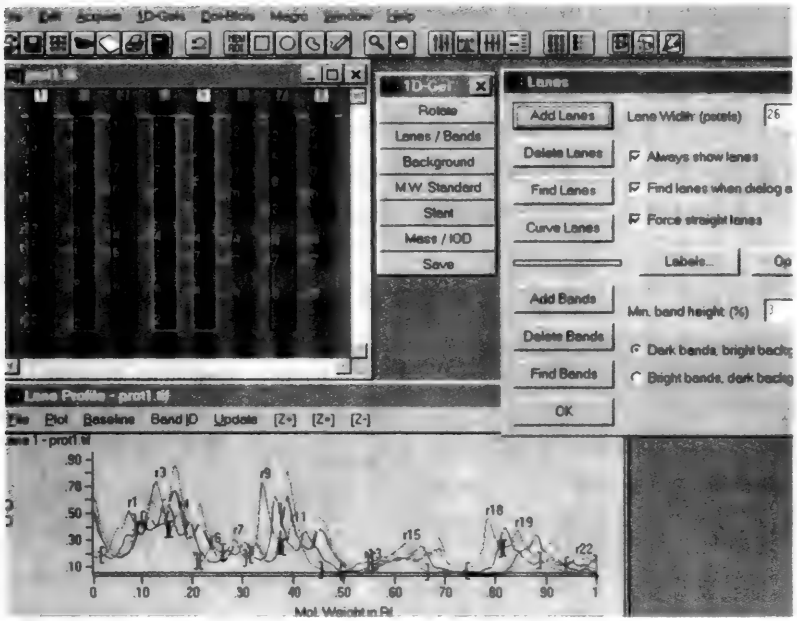


图 11.6　使用 Gel-Pro 分析器分析数字图像。图像由 Meida Cybernetics 免费提供（www. mediacy. com）

有意义的图像分析，要求能够理解基本的术语，以及知道与分析凝胶和文档数据有关方法的优缺点。因此，下面将对这种方法和实践中需要注意的事项做一个小结。

图像是物体得以可视化的表现。图像处理利用图像内的信息使图像更加有用。数字图像处理是使用电脑进行图像处理的一种特殊类型。简单地说，图像分析可以定义为对图像进行描述和定量。

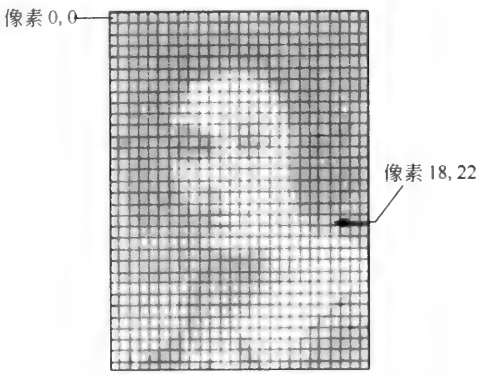


图 11.7　像素位图。Media Cybernetics 授权

数字化处理法利用水平方向和竖直方向的线将图像分成许多小格子。每一个格子叫作一个“图像元素”或像素（图 11.7）。在电脑中，图像通过数字化栅格或位图表现。一个像素通常只占一张图像的很小一部分区域。通常只有 $1/300in^2$（$1in^2 = 6.4516 \times 10^{-4}\ m^2$）或更少。在位图上，每一个像素可以根据它在位图中的位置表示，也就是它的横坐标（x 轴）和纵坐标（y 轴）的数值。按照惯例，像素通常从位图的左上方作为起点 0，0（行 0，列 0）。

一个图像（如一张电泳照片）数字化后，它将以栅格的形式进行分析。也就是说，图像中的每一个像素都是独立的样本，并且每一个像素的亮度都是独立定量的。这种对单个像素亮度的测量数值（通常是整数）代表了图像中那个位置的亮度和暗度。这个值作为代表图像位图中对应的像素储存在电脑中。当图像数字化以后，图像的宽度和高度值可以通过仪器选择并且固定下来。总的来说，位图的像素宽度和高度就是通常称作的空间分辨率。

依赖于硬件测量的能力和图像的复杂性，1～32 比特中任何一个位置都有可能用于存储

每一个像素的值。只包含黑白信息简单图像的像素值用单独比特代表：0＝黑，1＝白。对应的，类似于照片的图像包含了更多的信息，就需要用 24 比特来代表所有真彩色图像中可能出现的颜色。在一个图像中，使用比特数来代表像素的数值，它涉及像素的位深或每个像素的比特数（BPP）。BPP 的数量决定了图像的等级。

尽管比特数显示出一个图像能够处理的单一颜色数，但是它却不能显示出图像中存在什么颜色。对颜色的解释是由位深（bit depth）和图像等级决定的。图像等级包括：灰度色标 8；灰度色标 12；灰度色标 16。

灰度色标像素值代表从全白到全黑的灰度或亮度的等级。这种等级有时候称为“单色(monochrome)”。在一个 8 比特的灰度色标图像中，值为 0 的像素是全黑的，而值为 255 的像素则是全白的（图 11.8）。一个值为 127 的像素则是恰好在全黑和全白中间的灰色（半灰色）。而值为 64 的像素则是一个恰好处于全黑和半灰色中间的颜色。尽管比特深度为 2、4、6、12、16 和 32 的灰度色标值都存在，8 BPP 灰度色标图像则是最为常用的。这是因为：①1BPP的大小使得它便于使用电脑处理；②因为它有 256 种不同的灰度级别，使得它能够忠实地表现出任何灰度图像[1]。

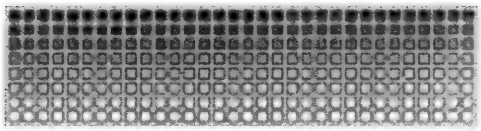


图 11.8　256 种灰度

提高凝胶图像质量以获得最多的有用信息，通常是很必要的。尽管有很多方法可以提高图像质量，但调整亮度、对比度和灰度校正是分析数字图像时最常用的方法。

亮度是用来描述图像光的总量参数。当亮度增加时，图像中每一个像素的值都会增加，即每一个像素值都更加接近 255；或者说每一个像素更加接近白色。同理，当亮度降低时，图像中每一个像素的值都会减少，即每一个像素值都更加接近 0；或者说每一个像素更加接近黑色。

对比度是用来表示图像中最亮和最暗部分间差别等级的参数。如果一张图像只含有灰色，或者说图像中每一个像素的值都在一个很狭小的范围内，那么这张图像的对比度就低。例如，一张图像中所有像素值都在 100～140 之间，那这张图像对比度就比较低。如果一张图像包含从全黑到全白的所有像素值，那它就有比较高的对比度。图像使用的总的强度表称为它的动态范围（dynamic range）。具有高对比度的图像也就具有宽的动态范围。

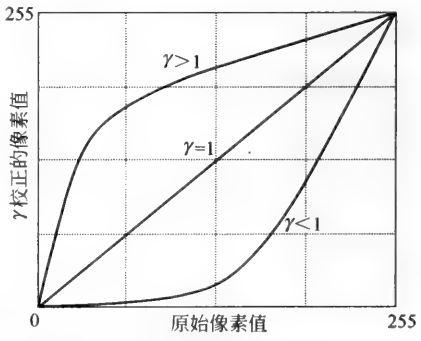


图 11.9　γ 校正曲线。该曲线对像素（0～255）的影响

灰度校正是提高对比度的一种特殊形式，它可以提高图像中特别亮或特别暗区域的对比度。它通过改变中间影调值，尤其是底部末端的值，来实现对比度调节，而不影响图像中的高光（255）和阴影（0）。灰度校正可以用于改善图像的表现，或者补偿不同的输入输出设备导致的同一幅图像的不同。灰度校正包括将标准的非线性的 γ 曲线应用于强度标（图 11.9）。γ＝1 表示对图像没有影响的标准曲线。增加 γ 值（γ＞1）可以使图像变亮，并增加暗部区域的对比度。降低 γ（γ＜1）值会导致图像整体变暗并增加高光区的对

[1] 人眼只能分辨出小于 200 灰度等级的图像。

比度。

另一类经常用于从凝胶图像收集数据的操作是密度分析。光密度（OD，即分光光度）分析是一类普遍的图像处理方法。它是通过测量穿透光的总量，来测定材料中某一物质总含量的一种普遍使用的方法。因为分光光度分析是测量透过物质的光的总量，所以这种方法只有在分析光源从物质后面发出的光照射获得的图像才有意义。总的来说，图像上的条带或其他元素的 OD 值与透过物质内部的光呈现指数式衰减。可以通过公式表示为：

$$\mathrm{OD}(x,y)=\frac{-\log[\mathrm{intensity}(x,y)-\mathrm{black}]}{\mathrm{incident}-\mathrm{black}}$$

式中　OD(x,y)——表示像素 (x,y) 的分光光度，即光密度；

intensity(x,y)——表示像素 (x,y) 的亮度；

black——指没有光透过物质时产生的亮度；

incident——指拍照的激发光所产生的亮度。

不能透过光的物体有一个无限大的 OD，而所有光都能透过的物体有一个值为 0 的 OD。因此，OD 标与强度标反向相关。也就是说，在 OD 标上，暗的像素的 OD 值很高，而亮的像素的 OD 值则比较低。

IOD 是指使用者定义的图的某一区域内，所有像素的像素值减去背景值的总和。在一个特定区域内，增加条带的大小或增加某个斑点的亮度都会使 IOD 值增高。在比较没有分子量标准的图像上不同条带之间亮度时，IOD 是一个非常有用的参数。

11.3.1　图像格式

数字图像可以储存在电脑的硬盘、软盘或 CD 上。在需要时可以调出来做进一步研究。因为数字图像可能会占据硬盘上很大的空间，通常可以在不损坏所需数据的情况下，对图像做尽可能多的裁减。一旦图像存储到硬盘上，它就已经具备了特定的格式。这些格式，通常由于它所支持的图像数据的类型不同，以及储存图像所需要的压缩程度不同而变化。凝胶图像通常以 TIFF 格式（*.tif）（tagged image file format，标签图像文本格式；tagged information field format，标签信息文本格式）保存。常用于图像存储其他图像格式有：BMP（bitmap，位图）、JPEG（joint photographic experts group，联合照相专家组）、GIF（graphics interchange format，图形交换格式）等。一旦存储在硬盘上，这些图像就可以像其他文件一样有可恢复性，并可以传输到网络或通过电子邮件传递。

11.3.2　实践中需要考虑的问题

多数科学工作者们首先要考虑的问题是凝胶成像系统以及软件的花费问题。毫不奇怪，不同版本、不同功能、不同的系统要求以及系统运行所需的硬件设施的仪器的价格会有很大的差别。如前面所建议的，许多设备齐全并且拥有非常多功能的系统都是很好的选择。这些系统很多都非常昂贵，并且常常超出实验室的预算。最好的方法是，系或部门能够买一台这种仪器让大家共享。其他的一些数字成像分析产品可以直接用于实验室已有的电脑上。除了购买图像分析软件的花费外，还需要投资购买一些图像捕获设备，如用来扫描宝丽来照片或其他图像的扫描仪、CCD 照相机或图像采集卡（frame grabber）。总的来说，图像分析软件的优点足以与它的价格相匹配（表 11.2）。

表 11.2　图像分析软件的优点

行使标准的用户化的测量方法
使实验室图像分析自动化并且标准统一
节省时间，增加处理图像的效率
提供可再生的图像分析①
提供亮度和背景校准
补偿不单一的图像背景
计算每个条带的 IOD、相对丰度、同一泳道上条带的质量分布，取代了旧的显像密度计量容易出现的错误
可以将图像存储到 Excel 等常用的软件内
可以通过 e-mail 以 TIFF 格式发送图像
将数字图像导入 Word 文档或 Power Point 文档也非常容易

① 图像分析的这一方面特别重要，因为大多数人倾向于高估凝胶和放射自显影胶片上条带的光密度积分。

使用图像分析软件的一个主要优点是可以使枯燥并耗时的操作实现自动化。即从凝胶图像上寻找条带位置以及分子质量分布，计算通常使用诸如手工绘出校准曲线，以及决定分子质量的密度计量学等一些陈旧的方法。数字图像分析能够减少实验室内的错误，并且能够明显提高需要处理大量图像的实验室的工作效率。此外，较好质量的图像分析软件与凝胶图像和 X 射线胶片以及发光测试方法获得的图像有完全的兼容性。它还完全能够以斑点印迹的形式分析条带和信号。除了经典的凝胶图像分析方法外，与芯片分析（第 23 章）以及其他一些有效的应用有关的新版本图像分析软件也已广泛应用。

很多人都误以为图像分析软件具有改善图像质量的能力。使用者必须意识到，如果扫描的是一张画质很差的凝胶图像，图像分析软件得到的也将是一个画质差的图像。如果凝胶的电泳没有进行足够的时间，图像分析软件也无法进一步分析电泳上的条带。图像分析软件对图像有效分析的前提是使用者必须提供质量好的图像。

背景校正是一个极具争议的领域，尤其是在对条带或整个泳道进行高精度定量时。这是图像分析的一个重要方面，但其本身具有内在的难点。主要是因为每块凝胶或每张图像上，每个位置的背景都不是相同的，而是每块凝胶都存在从左到右或者自上而下的背景梯度。同样的，有三种主要的解决途径。

① 检查图像中许多小的区域，然后只处理“本地的”背景（即所谓目的区域）。

② 在图像的几个中间位置放上指针，测定这些位置的背景作为样本，然后进行综合的背景扣除。

③ 在图像上许多不同的点上放置指针，然后减去图像上与之最接近的泳道上的背景。

在这三种方法中，第三种方法可以提供最好的精度和通用性。

由于凝胶成像有以上所提到的种种固有的局限性，所以研究者在处理时，也需要考虑不要混淆了同一凝胶上不同条带的真实量的差别。记住 255 是像素的最大可能值，如果一张图像中含有 255 的像素值，就说这张图像达到了饱和。尽管低于 255 的像素值在增加曝光量的时候也会增加其像素值，但最终会达到饱和。因为更长的曝光时间也不可能导致像素值超过 255。计算包含饱和像素的条带，与计算没有饱和像素的条带相比，通常会使计算值低于实际值。因此在计算包含饱和像素时的定量方法，也需要折中处理。最新一代的数字图像分析系统会在有些图像或所有图像都进入到饱和范围时提醒操作者，从而使操作者调整图像亮度，以避免“饱和导致的错误统计”。

11.4　参 考 文 献

Baxes, G. A. (1988). "Digital Image Processing-A Practical Primer," Cascade Press, Denver, CO.

Baxes, G. A. (1994). "Digital Image Processing-Principles and Applications." John Wiley & Sons, New York.

Castleman, K. R. (1996). "Digital Image Processing." Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Chellappa, R. (1992). "Digital Image Processing." IEEE Computer Society Press, Los Alamitos, CA.

Gonzalez, R. C., and Wirtz, P. (1987). "Digital Image Processing." Addison-Wesley, Reading, PA.

Media Cybernetics. (1996). *In* "Gel-Pro Analyzer Reference Guide," 2nd ed. Media Cybernetics, Silver Spring, MD.

Pratt, W. K. (1991). "Digital Image Processing," 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Russ, J. C. (1995). "The Image Processing Handbook." CRC Press, Boca Raton, FL.

（秦文明译；郭立涛校）

第 12 章　Northern 印迹分析

12.1　基本原理

RNA 的 Northern 分析技术（Alwine 等，1977，1979）问世至今，已经发展出了很多种变化形式。Northern 分析的核心，就是将凝胶上经电泳分离后的 RNA 分子转移或印迹（blotting）到膜上，以便固定以及与特定的一个或若干个探针杂交。因为转移到膜上的 RNA 谱带与电泳分离的谱带完全一致，所以 Northern 分析的杂交信号可以给出所研究样品表达模式的定性或半定量信息。另外，在 RNA 从凝胶印迹到膜上的过程中，RNA 富集到膜上相对较小的区域，有助于提高检测的灵敏度。Northern 分析适用于从组织样品或培养细胞得到的 RNA，也仍将是评估 mRNA 长度的常用技术。

现在有多种提取 RNA、制备变性琼脂糖凝胶、进行变性凝胶电泳以及将核酸从胶内转移到膜上的方法。研究者必须从以下几方面考虑，在实验前选择好方法。这些因素包括：所用膜的种类、固定的方法、探针的类型、探针标记的方式、杂交液配方以及检测方法。显然，要做的选择不少，而且为了避免实验过程中出现意外情况，在动手前列出每个步骤会颇有益处。Northern 的优化来自经验，而且往往需要在全过程的某些步骤做些改变。当一个实验室确立了优化的步骤，许多技术困难以及与重复性有关的问题就解决了。

那么 Northern 分析都有哪些内容呢？大体上是 RNA 电泳，接着转移并固定到膜上，然后与标记的 DNA 或 RNA 探针杂交，最后就是检测和分析杂交的结果。“Northern”这个术语是一种幽默，因为最初 DNA 电泳和印迹技术被称作“Southern”，得名来自于技术发明人 E. M. Southern（Southern，1975）。在前面章节中已经描述了 RNA 的提取、定量和电泳的方法。本章着眼于怎样选择滤膜和转移技巧，以及在膜上固定核酸的方法。后面的章节讲述杂交和检测的方法。

12.2　滤膜的选取

用 Northern 分析技术研究 RNA 需要做出的一个重要决定就是选取一个固体支撑物，以便通过电泳分析的 RNA 在杂交前转移过去。这个选择取决于对以下问题的认知：不同的支撑物在核酸结合能力、适用的转移方案以及固定方法上表现出很大的差异。还要考虑到探针检测的手段（如放射自显影或化学发光），因为有些滤膜不适合用非同位素的检测手段。此外，固定于滤膜上的 RNA 往往意味着消耗大量体力的努力工作。许多研究者希望用一系

列的探针来反复杂交这些 RNA。这就要求在检测之后，把杂交上的探针彻底洗脱；有些核酸印迹膜比其他种类的膜更经得起这种洗脱。这里给出了处理核酸滤膜的一般原则，关于核酸滤膜合理的详细处理建议，常由滤纸制造商提供。

市场上可以买到预先裁好的与实验室所用凝胶大小相配的核酸印迹膜，更常见的是可以方便地裁成各种尺寸的 3m 长的滤膜卷。所有的滤膜都是以三明治方式夹在两张起保护作用的衬纸之间。衬纸上通常印着生产厂家和滤膜的商品名，中间没有任何标记的那层是滤膜。一定要避免裸手碰触滤膜，因为手上的油脂会妨碍滤膜正常润湿（后面会讲到），降低膜对核酸的结合能力，以及给系统导入核糖核酸酶（RNase）污染。应该戴手套或用无 RNase 的镊子从角上拿取滤膜。做核酸印迹的实验室应该购置无粉手套，因为手套上的粉尘会在杂交检测时导致背景模糊。滤膜应该储存在阴凉干燥的地方，避光保存。使用前须避免冷藏、冷冻或受热。恰当保存的滤膜可以稳定保存很多个月。

12.2.1　硝酸纤维素膜

最早的 RNA 印迹技术，使用重氮苄氧甲基纤维素（DBM 纤维素）膜来固定核酸（Alwine 等，1977）。很快就发展成使用分子生物学的经典用膜——硝酸纤维素膜。使核酸固定到硝酸纤维素膜的化学基础是疏水本性。所需的最严格的参数就是需要高离子强度的转移缓冲液，以提高单链分子（RNA 或变性 DNA）的结合能力。通常印迹用的硝酸纤维素膜是 0.45μm 孔径，当然也有用 0.22μm 孔径的，特别是在做分子量较小的核酸时。尽管目前许多实验室仍在使用硝酸纤维素膜进行核酸印迹分析。但这种膜的特性使得人们要求使用别的更合意的膜。

① 硝酸纤维素膜结合核酸的能力相对较低（大约 80～100μg/cm²）。

② 对低分子量的核酸分子（比如少于 1000 碱基长度）结合能力非常差，大多数 PCR 产物不能有效印迹。

③ 硝酸纤维素膜有微弱的净负电荷，导致需用较高离子强度的转移缓冲液，通常是 20×SSC 或 20×SSPE 缓冲液❶。

④ 需要在真空炉里于 80℃ 烘烤硝酸纤维素膜固定核酸。烘烤时真空炉必不可少，因为潮湿会干扰固定过程。

⑤ 固定核酸所必需的烘烤过程会使硝酸纤维素膜变脆。这样后面的膜操作就需要极度小心，因而使操作显得十分困难。

⑥ 烘烤后的膜，很不牢固，也导致重复杂交不大可能。

⑦ 硝酸纤维素膜在使用非同位素方法时背景过深。

这种脆弱的特性，推动人们发展增强型的硝酸纤维素膜，比如 Optitrans 膜（Schleicher 和 Schuell，1987）。这种膜拥有一层高聚物背衬，同时保留了硝酸纤维素膜的各种特性，因而它比普通硝酸纤维素膜结实很多，可以经受得起更剧烈的操作。

12.2.2　尼龙膜

尼龙膜克服了硝酸纤维素膜内在不足所带来的诸多困难，它在大多数常规核酸印迹操作

---

❶ SSC，saline sodium citrate，柠檬酸钠生理盐水。20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，pH7.0。SSPE，saline sodium phosphate-EDTA，磷酸钠-EDTA 生理盐水。20×SSPE：3mol/L NaCl，0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$，0.02mol/L EDTA，pH7.4。

中已经取代了硝酸纤维素膜。尼龙膜的最突出优点，也许就是它良好的拉伸强度。这使得膜操作更加自如，膜的重复杂交也得以实现。有多种商品名的尼龙膜在分子生物学实验室广泛使用。它们分为两类：一类是表面电荷中性的尼龙膜，旧称尼龙 66；另一类是因表面氨基而带有净正电荷的膜。后者也常被称作电荷修饰膜，写作 nylon(＋)。与硝酸纤维素膜一样，许多印迹用尼龙膜是 0.45μm 孔径，同时也有 0.22μm 孔径的。尼龙膜，尤其是 nylon(＋) 膜，非常适合使用化学发光技术。与硝酸纤维素膜相比，尼龙膜结合核酸的能力有很大提高，有时结合核酸的量高达 400～500μg/cm^2，这取决于膜生产商以及研究者所用的转移缓冲液组分。尼龙膜对较小的核酸分子（500bp）也有特别的吸附力，这样就可以对小分子，包括 PCR 产物做常规的印迹。与硝酸纤维素膜相比，尼龙膜所用的转移缓冲液，其离子强度一般较低，经常低至 5×SSC 或 5×SSPE。尽管 nylon(＋) 所带的正电荷会增加目标 RNA 与膜的静电吸附，在预杂交和杂交时（如有可能）如经充分封闭，一般会得到背景干净的信号。然而，封闭或预杂交处理不好会导致过高背景，因为带正电荷的膜与具有负电荷磷酸骨架的探针间有非特异吸附。

尼龙膜的使用使研究者有更大的操作自由。可以使用烘烤或紫外灯照射固定核酸。烘烤尼龙膜也不需要真空炉，任何一种可以维持 65～70℃温度 1.0～1.5h 的仪器都可以。最棒的是，烘烤后的尼龙膜不会变脆。在耐受重复杂交方面，尼龙膜比硝酸纤维素膜好得多。最后，据报道，撕裂的尼龙膜可以用高温金属工具，如接种环或电烙铁修复（Pitas，1989）。在笔者实验室，撕裂一点的尼龙膜一般不会增加背景；将撕裂的两边仔细对好，再用塑料纸包住，压出来的 X 射线片上将看不出裂纹。

12.2.3 聚偏二氟乙烯膜

聚偏二氟乙烯膜（PVDF 膜）是含氟的有机聚合物，一直是 Western 杂交偏好使用的膜。现有报道，这种膜可用于 Northern 分析和 Southern 分析。以各种商品名市售的 PVDF 膜相当结实，化学稳定性好。这种膜平均孔径 0.45μm。紫外线照射或烘烤（无需真空炉），可使核酸不可逆交联到 PVDF 膜上。PVDF 膜也适用于多种非同位素方法。

12.3 膜的准备和取用

如前所述，不管选用哪种滤膜，都需要戴手套后才能取滤膜。用锋利的剪刀或手术刀将膜裁成合适尺寸（一般与电泳凝胶的大小相对应），裁好后应保留两面的衬纸以便拿取。剩下的滤膜应该马上放回储存处，以免意外溅脏或被 RNase 或 DNase 污染。一般而言，滤膜需要在盛有干净无菌水的托盘中预先浸湿 5min，然后再用所选的高盐转移缓冲液快速平衡。笔者实验室会备有一些专用于 Northern 膜的托盘。这些托盘只能戴手套取用，并用双氧水洗刷几分钟，再用灭菌水冲洗后才能使用。正确浸湿膜的方法，是使膜浮于水面上（强烈推荐高压灭菌水或 DEPC 处理水）。可以看到膜与水面接触瞬间立即从白色变成灰色。强烈推荐使用这种方法，因为它可以立即发现膜上任何的机械损伤，或被裸露的手碰到及因不当保存而损坏的区域，这些区域会出现模糊或不均匀润湿现象。用别的方法浸湿膜恐怕会忽略这些区域。当确认膜没有问题后，再晃动托盘，使膜沉入溶液，并浸泡至少 2min。

滤膜浸湿后转移到盛有转移缓冲液的托盘里快速平衡 30s 就足够了，当然在使用前也可以一直浸泡在转移缓冲液内。值得注意的是浸湿的顺序远比时间长短更重要：首先是水，然

后才是高盐的转移缓冲液。此后，就可以直接用于转膜。

12.4　Northern 转膜技术

主要根据从凝胶里抽提 RNA 的不同手段，可有多种方式将电泳分离的 RNA 从凝胶转移到固体支撑物上。应该记住，不管选用哪种技术，全长的 RNA 必须在干净的电泳槽电泳，并使用合适的凝胶以达到最好的分辨率。否则所得结果将不太理想。这里所述的转移技术一般同时适用于 Northern 分析和 Southern 分析。

12.4.1　毛细转膜法

所需仪器最少的方法是传统的被动毛细转膜法，经典的 Southern 分析技术（Southern，1975）也使用这种方法。它也是最省钱而又最费时的方法。简单地说就是用一叠吸水材料，如纸巾或印迹纸，将池子里的转移缓冲液通过凝胶吸到干的纸巾上。这样，随着转移缓冲液不断穿过膜被吸到纸巾堆的过程，RNA 样品就会从凝胶里洗脱出来，并被杂交膜捕获。按传统的做法，典型的毛细转膜装置需要把印迹膜放在凝胶上方，如图 12.1 所示。这种转膜方法通常有两个缺点：①转移效率差，尤其是大分子；②转移耗费太多时间。转移效率差通常与下列几点有关。

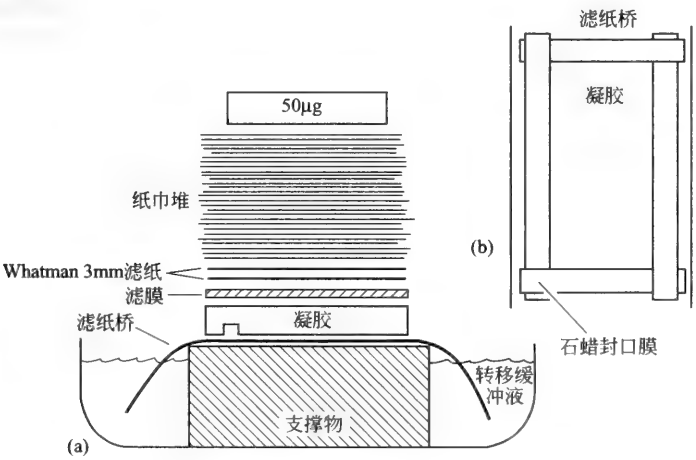


图 12.1　将 RNA 从变性琼脂糖凝胶转移到滤膜的典型装置。(a) 侧视图。将凝胶倒扣以减少转膜时间，并得到更高的分辨率。因为 RNA 分子不必一路穿过整个凝胶才能到达滤膜。(b) 上视图。把 Parafilm 膜头尾相交地搭在吸水的大滤纸上，再放凝胶（不能把 Parafilm 膜放在凝胶上）。先在凝胶四周把 Parafilm 膜摆好，然后再铺上杂交膜和其他东西

① 凝胶过厚。

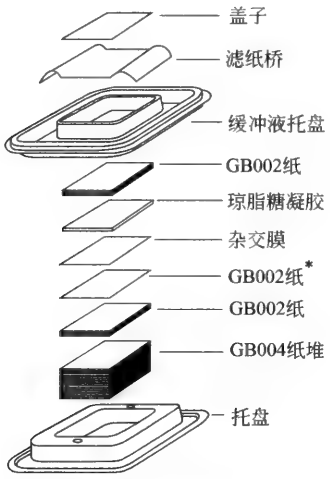
② 凝胶中琼脂糖浓度超过 1.2%。

③ 在电泳时或电泳后用了溴化乙锭，而没有正确洗脱掉（回忆一下那些代替溴化乙锭染色的好方法）。

④ 转膜前，没有充分浸泡凝胶以除去甲醛。

⑤ 没有用紫外照射凝胶，打断磷酸骨架以加速转移。

⑥ 转移时间不足。大多数毛细转膜法需要 16h 或更多，也就是说，需要过夜。



*预先用转移缓冲液湿润

图 12.2 涡轮印迹器转移法。目的就是翻转毛细转膜装置。由于利用了重力因素，高盐转移缓冲液快速向下移动从而加速了转膜，并提高了转移效率。吸水纸在底下而缓冲液在顶上，基本上是图 12.1 显示的倒过来放置的经典毛细转膜装置。经 Schlercher 和 Schuell 惠许

⑦ RNA 在开始转移时就降解了，这样的话，转膜再有效也无法得到杂交信号。

⑧ 上面所列情况的组合。

其他快速高效的转移技术已经出现并得到广泛应用，下面讲述其中的一些技术。

12.4.2 涡轮印迹器

涡轮印迹器（TurboBlotter）（Schleicher & Schuell，Keene，NH）向下转膜系统（图 12.2）利用了重力作用，与旧有的向上毛细转膜法相比，可以在很短时间内（通常短于 4h）实现高效转膜。笔者实验室观察到，使用涡轮印迹器时，绝大多数核酸分子在头 1h 内就从凝胶中转移出来。预先裁好与标准尺寸凝胶相配的滤膜和印迹纸。这个方法也无需在吸水材料上压上重物，避免把凝胶压实压垮。这个方法也无需任何贵重仪器，比如下面提到的真空印迹装置或电转移仪器。装起来也极其简单，笔者实验室的最快记录是 58s。

12.4.3 真空印迹法

真空印迹系统使用负压加速转移过程，也被称为真空协助的毛细转移法，实际上在此过程中，核酸样品与转移缓冲液一道从凝胶中被吸出来。因厂家不同，也有若干种真空印迹仪器可供选择。真空印迹的优点是，其转膜的时间（30～60min）比传统毛细转膜快很多（过夜）。快速转膜过程在一定程度上减少了核酸分子在印迹过程中的弥散，减少了原本在凝胶上很清晰的条带的扩散。然而，人们必须非常小心，不要对凝胶加太大的压力［30～50mbar（1bar＝10^5Pa）真空度比较合适］，因为凝胶破裂后这个实验就全毁了。真空印迹可以用于将核酸从琼脂糖凝胶内快速转移（Medveczky 等，1987；Olszewska 和 Jones，1988）；也可以用于将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶内转移，但电转印迹法（下面将讨论）会有更好的效果。

12.4.4 正压转膜法

与真空印迹相反，正压转膜是将核酸分子从凝胶里推出来。PosiBlot 装置（Stratagene，La Jolla，CA）利用正压力驱动缓冲液流过凝胶，从而在极短时间内（可短至 15min）将去嘌呤化的 RNA 或 DNA 转移到膜上，这比传统毛细转膜法快很多。与真空印迹一样，加快了的转膜过程，减少了核酸分子的扩散，电泳条带保持清晰。正压转膜大大减轻了凝胶破裂造成的问题，而这在真空印迹时，时有发生。

12.4.5 电转印迹法

电转印迹是另一种完全不同的转移方法。电转印迹广泛用于从聚丙烯酰胺凝胶中转移蛋白质。从琼脂糖凝胶中转移核酸时，这种方法用得较少。电泳转移是此类技术的一种形式，

它是将凝胶和膜贴在一起放入特制的盒子里，然后再装入盛有电泳缓冲液的容器中，即所谓缸式电转装置。对凝胶施加一个与初始电泳方向垂直的电压，样品就从凝胶里迁移出来并结合到滤膜上。它其实就是标准 Western 印迹所用的转膜方法。半干式电转法是此种技术的另一形式，只需要很少的缓冲液来饱和滤膜和印迹膜，让凝胶和仪器直接接触。它的优势在于转移只需低电压和低电流，摆脱了对高电流电源的依赖。有很多种商业化的电转装置可供选择（例如 Amersham Biosciences 公司提供的 Hoefer 产品系列）。电转印迹的速度直接跟电流大小相关。研究者应遵照厂商说明书操作，使用电源或其他高电压的仪器时应当非常小心。尼龙膜或硝酸纤维素膜都可以用于电转印迹；研究者须听取厂商的推荐。电转时会产生相当多的热量，很多操作手册都强烈建议在电泳前冷却电泳缓冲液，并在电泳时控制温度。Arnheim 与 Southern（1977）以及 Bittner 与他的同事（1980）对此有过总结。

12.4.6　碱印迹法

核酸的碱印迹法本质上是毛细转移法的一个分支。与毛细转移法相比，两者之间的主要区别是核酸变性的方法有差异。传统的毛细印迹操作使用高盐缓冲液［(15～20)×SSC 或 SSPE］把 RNA 或预先碱变性的 DNA 从凝胶中转移到膜上（多数情况下推荐正电荷修饰的尼龙膜）。碱法印迹 DNA 时，变性和转移是在 0.4mol/L NaOH 条件下同时进行的，随后将其固定到尼龙膜上。而做 Northern 转移时，有限度的碱裂解可促进 RNA 从凝胶中转到固体支持物上，但是必须非常小心以免 RNA 完全降解。有些膜经碱法转移后，无需固定步骤，这要看所用的具体参数。而且考虑到核酸探针与 rRNA 的非特异性结合，用碱法转移时转移缓冲液的具体成分和转移时间对信噪比影响极大。更详细的内容可参考 Reed 与 Mann（1985）、Li 等（1987）以及 Löw 与 Rausch（1994）。

12.4.7　实验方案：用被动毛细扩散法转移 RNA

注意　需要时参见图 12.1。

① 整个过程中均需戴手套。应极力避免任何核酸酶的污染。应当牢记 RNA 分子处于核酸酶降解的威胁之中，除非它们已经通过烘烤或交联固定到滤膜（比如尼龙膜）上以后。

② 用 EtBr 染色的或含有甲醛的凝胶，应当在无菌水或缓冲液内浸泡 2～3 次后，才能进行转膜。这步做不好会导致转移效率极差、样品丢失并妨害杂交的效率。

注意　将凝胶从一种溶液转移到另一种溶液时，用宽铲最方便。含甲醛的凝胶特别滑，须小心操作。

②a. 甲醛凝胶：把凝胶浸泡于过量的 5×SSC 或无菌水里，以除去甲醛。没染色的凝胶浸泡 3 次，每次 10min 即可脱去甲醛。若凝胶内有溴化乙锭，溴化乙锭也会同时被洗出来。甲醛凝胶中为拍照而染色的溴化乙锭会给杂交结果带来高的荧光背景，需要通过浸泡除去。彻底脱色需要两个多小时甚至更多，但这不是必需的。在笔者实验室，有时将甲醛凝胶放在过量的缓冲液内 4℃过夜脱色。用 SYBR 绿或 SYBR 金染色的凝胶无需脱色。当然，把凝胶浸泡在水中或 5×SSC 中可以加快甲醛的去除。

可选，但不推荐：把凝胶在 50mmol/L NaOH、10mmol/L NaCl 中浸泡 10min，然后在 100mmol/L Tris(pH7.5) 中浸泡 30min，最后在 10×SSC 中浸泡 30min。这样会造成 RNA 骨架部分碱裂解，可以帮助大的 RNA 分子从凝胶内转出，但通常却不是必需的。而且，RNA 在 NaOH 溶液中存放太久就无法与任何探针杂交了。随机打断 RNA 骨架可以提高转

移效率，这可以用紫外线透射仪，或者更简单一点，用定量的紫外线光源照射凝胶来实现。

②b. 乙二醛凝胶：染色（需要的话脱色）照相后可立即转移。因为转移后的预杂交洗涤过程可以去除乙二醛。

③ 修去凝胶的左边、右边（上下不动），目标泳道两边各留约 1cm 宽。

④ 按照凝胶的大小裁一片滤膜。决不能用裸露的手拿膜。多数滤膜沾到手指上的油脂后，其结合核酸的能力会下降。为了剪取与凝胶同大小的滤膜，可以将一个干的、干净的制胶板直接放在滤膜的衬纸上，用铅笔描出制胶板的轮廓。制胶板可以当作模子，这样不用尺子，所有的材料（滤膜、Whatman 滤纸以及吸水纸巾）都可以照它的样子裁得与凝胶相同的尺寸。在凝胶脱色或浸泡在缓冲液里的时候可以做这件事。经费宽余的实验室可以购买各种尺寸的合适的印迹材料。

⑤ 依照厂商说明书准备好滤膜。通常让尼龙膜或硝酸纤维素膜先漂浮在无 RNase 的水中，然后沉入水中至少 2min。旧的或脏的滤膜不能均匀润湿，漂在水面上时呈现不规则的水痕。这种滤膜应扔掉。

⑥ 滤膜浸泡 2min 后，放入转移缓冲液（尼龙膜用 5×SSC 或 5×SSPE）平衡 30s 或更长时间。滤膜可以放在转移缓冲液中直到使用。

⑦ 剪一张 Whatman 3mm 滤纸（或类似滤纸），滤纸比凝胶宽约 2cm，长约 15cm。此即滤纸桥。它是凝胶与缓冲液池之间的中介。若滤纸桥太长以后还能修短。

⑧ 将滤纸桥在转移缓冲液里浸 10s，在一个大烘烤皿（或类似器具）中放一块厚有机玻璃，然后把滤纸桥搭在有机玻璃上。

⑨ 往大烘烤皿注入足量转移缓冲液，让滤纸桥两端都有至少 3～4cm 浸入缓冲液里。

⑩ 滤纸桥下面的气泡，可以用无菌移液管轻轻赶出去。有气泡的地方转移效率较差。

⑪ 把凝胶点样孔朝下置于滤纸桥的中间，赶走凝胶与滤纸间的所有气泡。用 Parafilm 膜盖住凝胶四周的区域，以免转移过程中系统发生短路[1]。

⑫ 把滤膜仔细铺在凝胶上并赶走膜下所有气泡。

⑬ 剪 2～3 张与凝胶同大的 Whatman 3mm 滤纸（或类似的纸）。将至少一张滤纸用转移缓冲液浸透。

注意 临用前，浸湿至少其中一张滤纸。将挨着凝胶的那片滤纸预先浸湿会有效地推动毛细效应。

⑭ 把浸湿的 Whatman 3mm 滤纸铺在杂交膜上并赶走气泡。上面再铺干的滤纸。

⑮ 裁一叠与凝胶尺寸相同的吸水纸（压实了约 5～6cm 厚），这可以事先裁好。将这叠吸水纸摞在 Whatman 3mm 滤纸上。最后用一个 500g 的重物或课本放在上头压实整个装置。

注意 不要用有折痕的（如卷成 C 形）的吸水纸，折痕所对应的凝胶区域，转移肯定不充分。要是别无选择，可以将吸水纸重新摆放，不让折痕排齐对着凝胶的任何地方。必须要求毛细作用均匀。使用预先裁切的印迹纸，如 GB002 和 GB004（Schleicher & Schuell）可以替代吸水纸。

⑯ 转移数小时，可能的话转移过夜。

⑰ 转膜结束时，移去上面的滤纸和吸水纸。然后用镊子或戴手套的手从凝胶上小心揭下滤膜。剪去一角使之不对称并记录方向，这对准确解释杂交数据是必需的。

---

[1] 有时向上吸水的纸巾湿了之后会搭到凝胶下面，当滤纸比凝胶略大的时候更可能发生。倘若上面的吸水纸挨到凝胶周围的滤纸桥，它们就从凝胶的四周而不是通过凝胶吸缓冲液。通过凝胶的转移缓冲液变少，转移速度下降。为避免因此带来的困难，有些人切掉点样孔，这是不必要的。沿着凝胶四周盖上封口膜，可以避免纸巾与滤纸桥的直接接触。

⑱ 按厂家的建议冲洗转膜后的滤膜。一般是用没用过的转移缓冲液（比如 5×SSC 或 5×SSPE）洗膜 30s。

注意　转膜后的简单冲洗可以去除膜上可能沾有的残留凝胶或其他物品的碎片，这些碎片可能会影响样品的固定和杂交的特异性，或增加背景。

⑲ 尼龙膜应该在湿润时照紫外线，但也不能透湿；硝酸纤维素膜应该在空气中晾干，然后尽快烘烤。

12.4.8　实验方案：用涡轮印迹器向下转移 RNA

注意　参见图 12.2。

① 整个过程中操作者必须戴手套。应极力避免任何核酸酶的污染。应当牢记 RNA 分子在通过烘烤或交联固定到滤膜（硝酸纤维素膜、尼龙膜等）前，它都处于核酸酶降解的威胁之中。

② 用溴化乙锭染色或含有甲醛的凝胶，应当在无菌水或缓冲液内浸泡 2～3 次后，才能进行转膜。这步操作不好，会导致转移效率极差、样品丢失并妨害杂交的效率。

注意　宽铲最适合于将凝胶从一种溶液转移到另一种溶液。含甲醛的凝胶特别滑，须小心操作。

②a. 甲醛凝胶：把凝胶浸泡于过量的 5×SSC 或无菌水里以除去甲醛。没染色的凝胶浸泡 3 次，每次 10min 可脱去甲醛。若凝胶内有溴化乙锭也同时会被洗去。甲醛凝胶中为拍照而染色的溴化乙锭会带来高的荧光背景，需要通过浸泡除去。彻底脱色需要两个多小时甚至更多，但这不是必需的。在笔者实验室，有时将甲醛凝胶放在过量的缓冲液内 4℃过夜以脱色。用 SYBR 绿或 SYBR 金染色的凝胶无需脱色，虽然把凝胶浸泡在水中或 5×SSC 中可以有利于甲醛的去除。

可选，但不推荐：把凝胶在 50mmol/L NaOH、10mmol/L NaCl 中浸泡 10min，然后在 100mmol/L Tris（pH7.5）中浸泡 30min，最后在 10×SSC 中浸泡 30min。这样会造成 RNA 骨架部分碱裂解。这样可以帮助大的 RNA 分子从凝胶内出来，但通常却不是必需的。而且，RNA 在 NaOH 溶液中放太久，就无法与任何探针杂交。随机打断 RNA 骨架以提高转移效率，这可以用紫外线透射仪，或者更简单一点，用定量的紫外线光源照射凝胶来实现。

②b. 乙二醛凝胶：染色（需要的话脱色）照相后可立即转膜。乙二醛将在转膜后的预杂交洗涤过程中被去除。

③ 尽可能选用与电泳凝胶同样尺寸的预裁的印迹膜。如果凝胶稍大，可以在安装涡轮印迹器时修去多余的凝胶。倘若凝胶比印迹纸小，空出来的印迹纸要在随后的步骤中用封口膜遮住。

④ 按照凝胶的大小裁一片滤膜。决不能用裸露的手抓膜。多数滤膜沾到手指上的油脂后，其结合核酸的能力会下降。为了剪取与凝胶同大小的滤膜，可以将一个干的、干净的制胶板直接放在滤膜的衬纸上，用铅笔描出制胶板的轮廓。制胶板可以当作模子，这样不用尺子，所有的材料（滤膜、Whatman 滤纸以及吸水纸巾）都可以照它的样子裁切。在凝胶脱色或浸泡在缓冲液里的时候可以做这件事。经费宽余的实验室可以购买各种预裁的尺寸合适的印迹材料。

⑤ 依照厂商的说明书准备好滤膜。通常把尼龙膜（或硝酸纤维素膜）先漂浮在无 RNase 的水中，然后沉入水中至少 2min。旧的或/和脏的滤膜不能均匀润湿，漂在水面上时

呈现不规则的水痕。这种滤膜应扔掉。

⑥ 滤膜浸泡至少 2min 后，放入转移缓冲液（尼龙膜用 5×SSC 或 5×SSPE）平衡 30s 或更长时间。滤膜可以放在转移缓冲液中直到使用。

⑦ 将转移装置的底层托盘放在实验台上，一定要摆水平。

⑧ 在托盘里摆放 20 层干的 GB004 印迹纸。

⑨ 在 GB004 印迹纸上再铺 4 层干的 GB002 印迹纸。

⑩ 拿一张 GB002 印迹纸，用转移缓冲液浸湿后，铺在前述的纸堆上。用一根无菌的 5ml 移液管将它轻轻展平，赶走下面所有气泡。不能太用力。

⑪ 将平衡好的杂交膜铺在上面。

⑫ 仔细地把琼脂糖凝胶放在杂交膜上面，切去所有超出膜面积的凝胶和没用过的泳道的凝胶。一旦凝胶和杂交膜接触后就不要再移动凝胶。如果凝胶小于杂交膜，则杂交膜露出的部分要用 Parafilm 膜封住凝胶四周的区域，以免转移过程中发生短路。

⑬ 用一根灭菌的 5ml 移液管轻轻推平凝胶，确保凝胶与杂交膜之间没有气泡。

⑭ 用转移缓冲液浸湿 3 张 GB002 印迹纸，小心地将它们铺在顶上。

⑮ 用一根灭菌的 5ml 移液管赶走气泡。

⑯ 把转移装置的缓冲液托盘安放在底层托盘上，以环形的对齐按钮确保摆放正确。

⑰ 往上面缓冲液托盘注入转移缓冲液。别溅到两层托盘间的印迹纸和凝胶上。

⑱ 用转移缓冲液浸湿滤纸桥。用它连通缓冲液托盘和凝胶所在的纸堆启动转膜：把滤纸桥横跨纸堆短轴完全盖住印迹纸，两端分别浸入缓冲液托盘。

⑲ 用盖子掩住滤纸桥（如果有的话）或用 Parafilm 膜封住。强烈建议这样做，以避免蒸发以及盐的析出。

⑳ 继续转膜，直至转移缓冲液全部被吸干，这一般需要 3～4h。据测定，常规印迹时，绝大部分样品在转膜的第一个小时就已经从凝胶内转出（数据未显示）。

㉑ 转膜结束后，移去并扔掉凝胶上面吸饱水的滤纸桥和印迹纸。随后小心地用镊子或戴手套的手把杂交膜从凝胶上揭下来。剪去一角使之不对称并记录方向，这对准确解释杂交数据是必需的。

㉒ 按厂家的建议冲洗转膜后的滤膜。一般用新鲜的转移缓冲液（比如 5×SSC 或 5×SSPE）洗膜 30s。

注意 转膜后的简单冲洗可以去除膜上可能沾有的残凝胶或其他物品的碎片，这些碎片可能会影响样品的固定和杂交的特异性，或增加背景。

㉓ 尼龙膜应该在湿润时照紫外线，但也不能透湿；硝酸纤维素膜应该在空气中晾干，然后尽快烘烤。

12.5 转膜后膜的处理

12.5.1 甲醛变性系统

滤膜在杂交前可以放心保存一段时间，但还是有必要尽可能快地将转膜后的膜上样品固定在膜上。固定之后的 RNA 样品才稳定了，再不用 RNase 的降解。固定后，滤膜可以马上用于杂交也可以存储数月。滤膜晾干后，夹在 Whatman 3mm 滤纸间，放置在干燥避光处备

用。在准备印迹而进行脱色的过程中，凝胶内的甲醛可能已经去除干净了。

12.5.2　乙二醛变性系统

在电泳前用于变性 RNA 的乙二醛，此时必须从杂交膜上除去。

选项 1：滤膜晾干后按厂家的说明书烘烤，这样可以在破坏部分乙二醛的同时固定 RNA。要去除残留的乙二醛，可以将膜浸泡于 200ml 预热到 90℃ 的 20mmol/L Tris (pH8.0) 中，然后快速冷却到室温。

选项 2：固定之后，用 65℃的 20mmol/L Tris(pH8.0) 洗 15min，可以将 RNA 中的乙二醛去掉。

12.6　固定技术

转移后将膜上的靶 RNA 或 DNA 充分固定，这与保证转移完全是同等重要的。研究者必须认识到，核酸分子尤其是 RNA 分子，在固定到基质上之前是不安全的，它会受到核酸酶或自然生物降解的威胁。样品不能充分固定就不可避免地在预杂交、杂交、杂交后洗涤或检测过程中丢失。报道过的核酸固定方法有不少，它们各有各的优缺点和适用范围。笔者实验室几乎只用尼龙膜，因为它有极大的灵活性。任何情况下，对具体的膜，遵从厂家的推荐总是很明智的。这里只给出一些总的原则。

12.6.1　烘烤

经典的核酸固定技术须使用真空炉烘烤，以使样品结合到硝酸纤维素膜上。核酸与基质相互作用的真正原理还不清楚，人们认为应该是疏水作用。这种方法尽管有很多缺点却沿用至今。硝酸纤维素膜经转膜洗涤后彻底晾干，然后在抽真空的条件下于 80℃烘烤 2h。操作硝酸纤维素膜时，真空炉是必不可少的，因为水汽会干扰固定过程。烘烤肯定可以固定核酸，但这种固定却不是完全不可逆的过程，在几次反复杂交之后，部分样品会从膜的表面脱落，导致所有随后的检测定量不准。

用尼龙膜时，可以通过烘烤或紫外照射固定核酸样品。烘烤过程需要 1～1.5h，而温度只需达到 65℃。尽管使用真空炉可以加快干燥过程，并能提高核酸在膜上的结合，烘烤尼龙膜无需真空炉。有些实验方案认为潮湿的尼龙膜即可直接烘烤。

12.6.2　紫外线照射交联

更可靠的固定方法是使用定量的紫外线光源有效地把核酸[1]交联到尼龙膜上（Church 和 Gilbert，1984，Khandjian，1987）。应当避免对硝酸纤维素膜进行紫外线交联，因为这种膜通过紫外线照射交联固定的核酸，跟尼龙膜没法比。更重要的是，这种膜过度照射后起火的危险性很大。千万别这么做。

自从 Church 和 Gilbert（1984）将此方法用于基因组测序以来，紫外照射固定核酸于膜上的方法一直用得很好。短波长或中波长的紫外线（分别是 254nm 和 302nm）可以激发胸

[1] 除了交联的功能，紫外照射琼脂糖凝胶是随机打断 RNA 和 DNA 磷酸二酯键骨架的一种替代方案。它可取代稀 NaOH 溶液浸泡凝胶，以部分裂解核酸，而且重复性更好。核酸上的随机切口可以促进核酸从凝胶到膜的印迹。

腺嘧啶和尿嘧啶（其他碱基稍差）到高反应活性状态，并与尼龙膜表面氨基形成共价键。多种尼龙基质都有表面氨基（Saito 等，1981）。用湿的尼龙膜进行紫外交联效率更高，一般总能量仅需 120000μJ/cm²，作为对比，晾干的膜需要将近 160000μJ/cm² 能量。

与烘烤相比，这种方法固定于基质上的核酸更稳定，这也是一个重要的好处。许多实验室报道说，紫外交联比烘烤更灵敏。而且交联看起来比烘烤固定得更持久。对于打算对同一张膜反复杂交的研究者而言这一点尤为重要。反复、严格洗脱杂交膜上的探针往往导致目标分子从烘烤固定的膜上掉下来。

为实现核酸的固定已经发展出很多方法。最简单明了的方法当然是定量紫外线光源（比如 Stratalinker，Stratagene，La Jolla，CA）。这种仪器有自动交联功能，预设了 120000μJ/cm² 的能量输出。这对于湿润的膜正合适。当然也能够输出任何想要的能量。倘若没有定量紫外线光源，一个标准实验用的紫外线透射仪也可以，不过因为缺乏校正设备，恐怕需要多次试验并有错误。大多数分子生物学实验室用的紫外线透射仪的波长不是 302nm（中波长）就是 254nm（短波长）。相对于 254nm 的紫外灯，强烈推荐用 302nm 紫外灯进行交联实验。短波长过量照射后，导致印迹的核酸损失很多，所以会降低灵敏度。湿润的膜可以直接摆在紫外线透射仪表面进行照射。

12.6.3 实验方案：将 RNA 紫外交联于尼龙膜上

① Northern 转膜后，按以前所述的方法冲洗滤膜，将已带有 RNA 的滤膜放在 1～2 层 Whatman 滤纸上吸干过多的液体。不要让膜完全干燥，最好在滤膜还有些湿润的时候进行紫外照射。

② 将紫外线透射仪表面擦干净，将滤膜的正面（有样品的一面）朝下放在透射仪表面。

当心 千万适当保护好眼睛，倘若没有正确防护，眼睛和皮肤会受到严重的永久性损伤。

③ 合适的曝光时间与波长及仪器的使用年限有关。发射 302nm 的仪器，通常曝光 1min 已足够。而 254nm 的仪器，不到 1min 交联就完成了。

注意 1 这些只是大体原则。每个仪器的具体参数要靠实验摸索。

注意 2 笔者实验室是先照射估算时间的一半，将膜旋转 90°后，再照射剩下的时间（转动膜的时候，别忘记关紫外灯）。建议旋转是考虑到透射仪内的灯管是平行排列的。老的仪器中有些灯管可能已经坏了。这要看具体的仪器，而不是必须要做的。

④ 将交联后的膜夹在两张 Whatman 3mm 滤纸中，保存于避光、干燥的地方备用。

在多数方案里，费时不超过 1min 的紫外线交联已经取代了在真空炉里烤 2h。除了用于交联，定量紫外线光源还可以用来随机打断染色的 RNA 或 DNA 凝胶，以促进完全转膜。

12.7 固定后膜的处理

转膜和固定完成之后，Northern 分析的时间表就轻松多了。应该非常清楚，从细胞裂解开始，直到这一刻，各种涉及不稳定 RNA 的操作，包括 poly(A)⁺ 纯化（有必要的话）、测定浓度和纯度、电泳、印迹、核酸酶保护分析（第 16 章）和反转录成互补 DNA(cDNA)（第 18 章）等，都必须围绕着 RNA 分离的具体日期尽快进行。一旦样品固定到固体支持物（滤膜）上，就可以保存数月直到方便进行杂交或再杂交实验。

应该记取的重要事情是：没有杂交的膜需要干燥保存或放真空干燥器以免受潮或微生物侵蚀。已经杂交的或要再次杂交的膜，在完成杂交检测后，应该尽快用高严谨的条件洗掉旧的探针。旧的探针尚未洗掉前，别让滤膜干透。探针洗净后的膜应该保持湿润，用塑料包起来。膜一旦干后，想洗掉上面杂交的探针就极为困难了。

12.8 参考文献

Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74,** 5350.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R., and Wahl, G. M. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol.* **68,** 220.

Arnheim, N., and Southern, E. M. (1977). Heterogeneity of ribosomal genes in mice and men. *Cell* **11,** 363.

Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, C. F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **102,** 459.

Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81,** 1991.

Khandjian, E. W. (1987). Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Biotechnology* **5,** 165.

Li, J. K., Parker, B., and Kowalik, T. (1987). Rapid alkaline blot-transfer of viral dsRNAs. *Anal. Biochem.* **163,** 210.

Löw, R., and Rausch, T. (1994). Sensitive, nonradioactive Northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *BioTechniques* **17,** 1026.

Medveczky, P., Chang, C. W., Oste, C., and Mulder, C. (1987). Rapid vacuum drive transfer of DNA and RNA from gels to solid supports. *BioTechniques* **5,** 242.

Olszewska, E., and Jones, K. (1988). Vacuum blotting enhances nucleic acid transfers. *Trends Genet.* **4,** 92.

Pitas, J. W. (1989). A simple technique for repair of nylon blotting membranes. *BioTechniques* **7,** 1084.

Reed, K. C., and Mann, D. A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* **13,** 7207.

Saito, I., Sugiyama, H., Furukawa, N., and Matsuura, T. (1981). Photochemical ring opening of thymidine and thymine in the presence of primary amines. *Tetrahedron Lett.* **22,** 3265.

Schleicher & Schuell, Inc. (1987). "Transfer and Immobilization of Nucleic Acids to S & S Solid Supports." Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98,** 503.

（陈祥龙译；金由辛校）

第 13 章　核酸探针技术

13.1　基本原理

分子生物学的核心，就是两条互补的核酸链通过碱基配对形成双链结构。这一过程叫作杂交（hybridization）。在任何一次杂交实验中，两条核酸链分别具有不同的名字。在经典分子生物学技术中，例如 Northern 分析和 Southern 分析中，用于杂交的互补双链，其中一条链叫作靶（target），这条链通常是固定在滤膜上，如前面章节所述；另一条链叫作探针（probe），携带着可以通过实验探测到的某种标记物。探针通常溶解在具有特定 pH 和离子强度的溶液（杂交液）中，在杂交液中与互补链进行碱基配对，这些互补链固定在滤膜的表面。这种杂交方式叫作混合相杂交（mixed-phase hybridization）。通过放射自显影或化学荧光，探针在滤膜表面得以定位和定量，实验到此完成。

杂交还可以以另一种方式进行：杂交的两条链都可以自由移动，探针链和靶链碱基的配对由随机碰撞动力学驱动。因为任何一条链都没有固定在滤膜上，杂交完成的速度要远快于在混合相杂交中所看到的。没有滤膜的存在也提高了实验的灵敏度，其系数至少为 10。例如，核酸酶保护实验（见第 16 章）、聚合酶链反应（PCR）（见第 19 章）都是在溶液中进行的杂交技术。

对于特定的实验选择最合适的探针种类，像选择合适的定位和定量杂交反应方法一样重要。在理想的情况下，需要探针和杂交反应中所有与之互补的序列进行杂交。由于核酸探针的超强分辨能力，使它应用极广。下面就是核酸探针的部分应用。

① 基因表达变化的定量或定性分析。

② 基因扩增或缺失。

③ 基因重排。

④ 染色体转位。

⑤ 点突变。

⑥ 细胞中存在的新的遗传序列（病原体）。

此外，用于 PCR 的寡核苷酸引物通常可以与经典分子生物学技术中的核酸探针换用。

如前所述，核酸探针是带有某种标记（label）或标记物（tag）的寡核苷酸。标记使研究者在整个实验中对探针进行跟踪，而且标记至少提供了半定量的检测方法。从历史上来看，探针的合成（例如标记的掺入）和检测完全依赖于高效的放射性标记的掺入，以及接下来的放射自显影检测技术。主要的方法是放射标记的 dNTP 前体的掺入。但是，现在新的

研究面临更迫切的问题是：什么情况下使用化学荧光的非同位素标记和检测方案来替代同位素标记和放射自显影？

一个并不直接的回答是：通常情况下都可以，主要依赖于实验所需要的精确性和灵敏度。大多数情况下，非同位素方法几乎和所有涉及把样品固定到滤膜（非硝酸纤维素膜）的分子生物学操作相兼容。这些应用有 Northern 分析、Southern 分析、Western 分析、斑点杂交和条带杂交分析、菌落杂交、噬菌斑筛选，以及并不基于滤膜的原位（*in situ*）杂交。笔者常常提及的经验估计法是："通过放射自显影的方法，在 3 天之内所压胶片上能看到条带的话[1]，那么你用化学荧光的方法替代就是可能的，而且不失灵敏度和分辨率。如果放射自显影需要 3 天以上的时间，非同位素方法就不能与其兼容了。"

一些并非基于滤膜的技术，包括高灵敏度的核酸酶保护实验和核逃逸实验，用放射性标记可以达到最好的效果。在很多情况下，基于 PCR 的技术革新已经替代了部分旧技术。

13.2　探针的分类

核酸探针可以是均一化的，也可以是非均一化的。这些探针既可以是 DNA 分子，也可以是 RNA 分子。在同一杂交溶液中，如果所有的探针都是相同的，这个探针就被称作均一的。例如，在一个实验中，在所给的样品中检测常见的 *c-fos* 的转录产物，每一个探针分子都是带标记的人类 *c-fos* 癌基因的互补 DNA 序列（cDNA）。非均一探针是指包含了两种或两种以上序列的核酸探针，这些探针可以是很相近的核酸序列，也可以是完全不同的核酸序列。例如，在构建差异表达库的过程中，其目标就是通过和另一类细胞对比的方法，除去所有共同表达的基因，找出那些在特定细胞中特异表达的 mRNA。因此，在杂交过程中，探针可能由几千种不同的序列组成。另一个例子是，几种不同的寡核苷酸序列同时存在于同一杂交反应中，这是由于研究者不清楚和目的靶分子有关的基因序列。当准备采用非均一探针去杂交时，应当避免选用那些已知具有中度和高度重复序列的靶基因（如 *Alu*），这样不至于产生大量的干扰的杂交信号。

13.3　标记系统的选择

在选择标记系统时，有以下关键的几点需要考虑。

① 要达到的灵敏度和分辨率。

② 标记掺入的方法。

③ 标记后探针的稳定性。

④ 杂交的类型。

⑤ 期望的检测方法。

标记核酸有三种基本方法可供选择：①放射性标记；②半抗原标记［如生物素、荧光素（FL）、地高辛（DIG）］，支持化学发光、化学荧光或发色技术等非同位素检测方式；③直接的酶标记。在大多数情况下，这些技术在用来标记包括 DNA、RNA 和寡核苷酸的应用中是通用的。这些操作技术的方法、优点和缺点将在本节中详述。此外，对于合成核酸探针来说，多种系统已商业化；而且，为了达到最优的灵敏度和分辨率，每种系统都有一套自己的检测方法。

[1] 放射自显影需使用增感屏，在－80℃进行。

根据标记在核酸探针分子上的位置，探针还可进一步细分为亚类，这种分类一目了然地让人看出所用标记技术的功能。探针的标记有末端标记和连续标记，每一种下面有举例。末端标记探针是指将标记加到探针的 5′末端（例如通过激酶反应）或 3′末端（例如通过末端转移酶[1]）。连续标记是指沿着分子骨架以规律的间隔进行标记。连续标记的探针的例子有随机引物法、PCR、体外转录或补骨脂素-生物素（psoralen-biotin）交联法，但不限于此。是选择末端标记还是选择连续标记取决于以下几点。

① 探针是 DNA 还是 RNA。

② 探针是双链还是单链。

③ 如果是双链，探针的 5′末端和 3′末端是凹进还是突出。

④ 标记掺入的水平（直接与所需的灵敏度水平相关）。

⑤ 所要标记探针的长度。

⑥ 如果是双链，探针是线性的还是闭合的环状结构（如质粒）。

这些因素的权衡考虑将在下面详细讨论。

13.3.1 同位素标记

当心 使用和存储放射性材料时，应当按照同位素常识和操作规则去做。无论是什么同位素或是它有多少比活力，在任何时刻都必须穿实验服，戴一次性手套，眼睛佩戴防护镜，以及接受适当的培训。不论是使用还是靠近同位素，必须严格坚持部门的和制度的管理，包括同位素的防护、操作、处理实验室安全；而且，其他危险材料也应当如此管理。在任何时候，放射性安全办公室都应当考虑到特殊的应用和广泛适用的规定。

在很多应用中，同位素都有极高的灵敏度，以及在各种标记技术中的通用性。但同位素标记也有一些固有的缺点，包括同位素的半衰期[2]问题，对健康潜在的危害，放射性污染，昂贵的价格，同位素垃圾处理的高成本，探针的稳定性和标记的有效性，以及相对较长的检测时间。

表 13.1 ^{32}P 衰变数据

	衰变时间/天									
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
0	1.000	0.976	0.953	0.930	0.908	0.886	0.865	0.844	0.824	0.804
5	0.785	0.766	0.748	0.730	0.712	0.695	0.678	0.662	0.646	0.631
10	0.616	0.601	0.587	0.573	0.559	0.545	0.532	0.520	0.507	0.495
15	0.483	0.472	0.460	0.449	0.438	0.428	0.418	0.408	0.398	0.388
20	0.379	0.370	0.361	0.353	0.344	0.336	0.328	0.320	0.312	0.305
25	0.297	0.290	0.283	0.277	0.270	0.264	0.257	0.251	0.245	0.239
30	0.233	0.228	0.222	0.217	0.212	0.207	0.202	0.197	0.192	0.188
35	0.183	0.179	0.174	0.170	0.166	0.162	0.158	0.155	0.151	0.147
40	0.144	0.140	0.137	0.134	0.130	0.127	0.124	0.121	0.118	0.116
45	0.113	0.110	0.107	0.105	0.102	0.100	0.098	0.095	0.093	0.091
50	0.088	0.086	0.084	0.082	0.080	0.078	0.077	0.075	0.073	0.071
55	0.069	0.068	0.066	0.065	0.063	0.062	0.060	0.059	0.057	0.056
60	0.054	0.053	0.052	0.051	0.049	0.048	0.047	0.046	0.045	0.044

注：物理半衰期 = 14.29 天。

[1] 末端脱氧核苷酸转移酶

[2] 为了方便读者，常用同位素半衰期数据见表 13.1 — 表 13.4（数据由 PerkinElmer Life Sciences 惠赠）。

表 13.2　^{33}P 衰变数据

	衰变时间/天									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1.000	0.973	0.947	0.921	0.897	0.872	0.849	0.826	0.804	0.782
10	0.761	0.741	0.721	0.701	0.683	0.664	0.646	0.629	0.612	0.595
20	0.579	0.564	0.549	0.534	0.520	0.506	0.492	0.479	0.466	0.453
30	0.441	0.429	0.418	0.406	0.395	0.385	0.374	0.364	0.355	0.345
40	0.336	0.327	0.318	0.309	0.301	0.293	0.285	0.277	0.270	0.263
50	0.256	0.249	0.242	0.236	0.229	0.223	0.217	0.211	0.205	0.200
60	0.195	0.189	0.184	0.179	0.174	0.170	0.165	0.161	0.156	0.152
70	0.148	0.144	0.140	0.136	0.133	0.129	0.126	0.122	0.119	0.116
80	0.113	0.110	0.107	0.104	0.101	0.098	0.096	0.093	0.091	0.088
90	0.086	0.084	0.081	0.079	0.077	0.075	0.073	0.071	0.069	0.067
100	0.065	0.064	0.062	0.060	0.059	0.057	0.055	0.054	0.053	0.051
110	0.050	0.048	0.047	0.046	0.045	0.043	0.042	0.041	0.040	0.039
120	0.038	0.037	0.036	0.035	0.034	0.033	0.032	0.031	0.030	0.030

注：物理半衰期＝25.4 天。

表 13.3　^{35}S 衰变数据

	衰变时间/天									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
0	1.000	0.976	0.954	0.931	0.909	0.888	0.867	0.847	0.827	0.807
30	0.788	0.770	0.752	0.734	0.717	0.700	0.683	0.667	0.652	0.636
60	0.621	0.607	0.592	0.579	0.565	0.552	0.539	0.526	0.514	0.502
90	0.490	0.478	0.467	0.456	0.445	0.435	0.425	0.415	0.405	0.395
120	0.386	0.377	0.368	0.359	0.351	0.343	0.335	0.327	0.319	0.312
150	0.304	0.297	0.290	0.283	0.277	0.270	0.264	0.258	0.252	0.246
180	0.240	0.234	0.229	0.223	0.218	0.213	0.208	0.203	0.198	0.194
210	0.189	0.185	0.180	0.176	0.172	0.168	0.164	0.160	0.156	0.153
240	0.149	0.146	0.142	0.139	0.136	0.132	0.129	0.126	0.123	0.120
270	0.118	0.115	0.112	0.109	0.107	0.104	0.102	0.099	0.097	0.095
300	0.093	0.090	0.088	0.086	0.084	0.082	0.080	0.078	0.077	0.075
330	0.073	0.071	0.070	0.068	0.066	0.065	0.063	0.062	0.060	0.059
360	0.058	0.056	0.055	0.054	0.052	0.051	0.050	0.049	0.048	0.046

注：物理半衰期＝87.4 天。

表 13.4　^{3}H 衰变数据

	衰变时间/月											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	1.000	0.995	0.991	0.986	0.981	0.977	0.972	0.968	0.963	0.959	0.954	0.950
1	0.945	0.941	0.936	0.932	0.928	0.923	0.919	0.915	0.910	0.906	0.902	0.898
2	0.893	0.889	0.885	0.881	0.877	0.873	0.869	0.865	0.860	0.856	0.852	0.848
3	0.844	0.841	0.837	0.833	0.829	0.825	0.821	0.817	0.813	0.810	0.806	0.802
4	0.798	0.794	0.791	0.787	0.783	0.780	0.776	0.772	0.769	0.765	0.762	0.758
5	0.754	0.751	0.747	0.744	0.740	0.737	0.733	0.730	0.727	0.723	0.720	0.716
6	0.713	0.710	0.706	0.703	0.700	0.697	0.693	0.690	0.687	0.684	0.680	0.677
7	0.674	0.671	0.668	0.665	0.661	0.658	0.655	0.652	0.649	0.646	0.643	0.640
8	0.637	0.634	0.631	0.628	0.625	0.622	0.619	0.616	0.614	0.611	0.608	0.605
9	0.602	0.599	0.597	0.594	0.591	0.588	0.585	0.583	0.580	0.577	0.575	0.572
10	0.569	0.567	0.564	0.561	0.559	0.556	0.553	0.551	0.548	0.546	0.543	0.541
11	0.538	0.535	0.533	0.530	0.528	0.526	0.523	0.521	0.518	0.516	0.513	0.511
12	0.509	0.506	0.504	0.501	0.499	0.497	0.494	0.492	0.490	0.487	0.485	0.483

注：物理半衰期＝12.28 年。

标记核酸探针最常用的同位素有^{32}P、^{3}H和^{35}S，^{33}P也偶尔使用。同位素标记在核苷三磷酸前体一定的位置（α或γ）。这样，通过酶的作用将核苷酸中带有同位素的部分转移到需要标记的分子上。操作方式和检测方法决定着同位素的选择。例如，^{32}P标记的探针发出的长程β粒子，使这种标记可以用来在X射线胶片上记录杂交事件；然而，由于同样的原因，在解剖学上将^{32}P标记的探针用于RNA靶的原位杂交，其分辨率就不足，也就是说不能反映靶RNA在组织或细胞上的精确位置，需要使用其他的标记和检测系统。

.^{33}P的应用减轻了^{32}P所产生的危险。^{33}P标记的核苷酸在常见的分子生物学应用中可以作为一个选择，特别是DNA测序中（Zagursky等，1991）。^{33}P的半衰期是25.4天，其β粒子的最大能量是E_{max}－0.25MeV，大约为^{32}P(E_{max}＝1.71MeV）的1/7[1]。NEN Life Science Products公司（现隶属PerkinElmer）表示，^{33}P可以在实验台上以普通的放射性安全标准进行操作，而不必像操作^{32}P那样需要特殊的防护。

13.3.1.1 如何将降解问题减到最低

核苷酸的保存期限依赖于两个因素：放射性同位素的半衰期和它的生物学半衰期。虽然同位素半衰期是固定的，但生物降解率却因对材料的操作及温度而变化。放射性标记核苷三磷酸的存储位置（在冰箱中还是室温下）可以改变它的衰变率和生物降解率。降解产物主要包括核苷单磷酸和无机焦磷酸，核苷二磷酸也可能存在。核苷酸应当在干冰中运输，存储温度要低于－20℃，条件许可的话，最好存储在－80℃。不提倡存储在无霜冰箱中。

下面列出部分降低放射性化学品降解问题的建议。有关放射性化学品的安全操作和使用的更完全的细节，可以参阅PerkinElmer Life Sciences的《研究用放射性材料安全操作指南》，可以在线阅读（www.perkinelmer.com/lifesciences），本章所列出的下列几点就是从该参考书中摘取的[2]。

① 拿到同位素化学品后尽快使用。延长存储时间会导致额外的原子核衰变。增加衰变次数，就导致同位素化学品的大量降解。即使是同位素化学品没有开封，存储在最理想的条件下，这种降解也会发生。

② 适当地存储样品。每一个产品都有技术资料卡片，上面有对这个产品的存储条件的描述，对此要多加注意。

③ 当打开一个盛有放射性化学品的包装后，要按照技术资料卡片上的说明行事。存储条件也需参考这些说明。

④ 存储在水溶液中的^{3}H标记放射性化学品，以及^{35}S、^{125}I和^{32}P标记的生化试剂应当在室温下解冻，直至融化。^{125}I和^{32}P标记的核苷酸不在此例，应当快速解冻。在低温下存储的放射性化学品需要缓慢解冻，建议放在冰箱中或冰上。

⑤ 放射性化学品不能长时间室温放置，因为这样会急剧加速它的降解速度。

⑥ 尽量减少原始存储容器的开启次数，每次使用后应当立即重新封好。如果某种化合物需要使用很多次，将需要的用量分装在独立的小管子中。每次使用这些溶液时，就会引入一些杂质，特别是氧气和水。

⑦ 当从原始容器中分装放射性化学品时，使用干净的注射器和枪头，因为很多生物学

[1] ^{33}P数据由PerkinElmer Life Sciences惠赠。

[2] 数据的使用得到了授权。

实验中所用到的缓冲液和盐对放射性化学品是有害的。

13.3.1.2　比放射性

在标度日期之前的任何一天，^{32}P 标记核苷酸的比放射性可以通过以下公式计算出来：

$$SA(Ci/mmol)=\frac{SA\ cal.}{Df+SA\ cal.\ (1-Df)/9120}$$

式中　SA cal.——标度日期的比放射性；

Df——衰变因子，由衰变图表中所得；它是当前放射性的分数，当前放射性是指标度日期的放射性；

9120——无稳定同位素载体稀释的^{32}P 的理论比放射性。

在标度日期之后的任何一天，^{32}P 标记的核苷酸的比放射性可以通过下面公式计算出来：

$$SA(Ci/mmol)=\frac{Df}{\frac{1}{SA\ cal.}-\frac{1-Df}{9120}}$$

13.3.2　非同位素标记

为了尽量减少放射性同位素的使用，以及放射性同位素本身在实验室中所产生的危险，发展出了各种非同位素标记和检测方法。得益于在过去 5 年中的种种精妙改进，有多种系统可以在根本不用放射性同位素的情况下，实现极低下限的检测。在很多情况下，非同位素标记所达到的灵敏度和^{32}P 是相当的，这在很大程度上依赖于操作者的耐心。比较而言，各种非同位素标记和检测系统提供了相似的灵敏度和分辨率，但它们又有很明显的不同，这在于：①从使用者角度看，它们相对复杂；②多个步骤必须由使用者亲自操作，特别是系统中和检测组分有关的步骤。常用的非同位素标记法有生物素标记、DIG 标记、FL 标记和直接的酶标记。生物素、DIG 和 FL 标记可通过显色反应和化学发光的方法检测。在大多数显色反应检测技术中，由于化学荧光技术本身难度高，这类检测方法没有得到广泛的使用。然而在如今的分子生物学实验室中，利用化学发光和一些显色反应检测技术，高效非同位素标记法已成为实验室的常用技术。尽管抛弃使用放射活性探针的想法是令人向往的，但研究者必须意识到，和“热”探针使用方法相比较，非同位素标记技术其探针纯化和检测方法可能是完全不同的。用过^{32}P 的人会注意到，非同位素标记最大的变化就是大量的时间都被用到检测步骤上了。通常情况下，多步骤的洗涤和杂交后的封闭是必需的。而且，一旦使用了化学发光底物，就绝对不能再用更严格的条件去洗涤滤膜，除非完全重复杂交后洗涤、封闭这一系列过程。但是，从安全和经济的角度来看，抛弃使用同位素所得到的好处，远远超过了这种复杂检测方法所带来的不便。

13.3.2.1　生物素

生物素是一种小的水溶性的维生素，它可以很容易地共价连接到多种生物大分子上。探针的生物素标记可以通过多种方法完成。

① 酶促法，使用生物素化的核苷酸。

② 光化学法，使用具有光活性的生物素或补骨脂素-生物素。

③ 化学方法，在合成寡核苷酸的过程中完成。

虽然寡核苷酸 5′端标记生物素是最容易最有效的标记方法，但从检测的角度来看，生物素标记在探针的哪一部分确实无关紧要。生物素标记几乎从不影响探针的生物学活性，而

且在生物素标记的核苷酸中，如 Bio-11 dUTP❶（图 13.1），生物素和探针骨架之间的连接臂有效地降低了空间阻碍作用。生物素标记的探针在－20℃下至少可以保存 1 年。

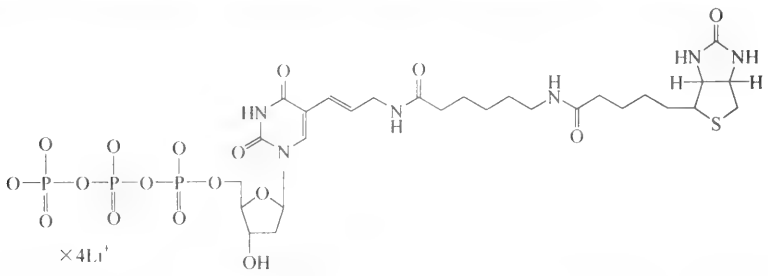


图 13.1　生物素 11-dUTP(Bio-11-dUTP)

极少分子能像链霉亲和素（streptavidin）那样与生物素有很强的自然的亲和力（K_d＝10 $^{-15}$L/mol）。链霉亲和素是一个四聚体蛋白（M_w 60000），从链霉菌（*Streptomyces avidinii*）中分得，具有四个生物素结合位点。和普通亲和素（来自卵清）不同，链霉亲和素的等离子点为中性，在生理 pH 值下，带电基团极少，不含糖基。这些特性降低了非特异性结合和背景问题，从而提高了灵敏度。在多种核酸杂交检测和相关技术中，生物素-链霉亲和素的操作已经得到应用（Leary 等，1983；Wilchek 和 Bayer，1984；Hoffman 和 Finn，1985）。因此，在基于生物素标记的检测系统中，最初几步中就有一步是生物素和制备好的链霉亲和素结合。在大多数系统中，链霉亲和素是经过修饰的，通常是连接在碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）上的；但在其他一些系统中，链霉亲和素连接的是辣根过氧化物酶（horseradish peroxides，HRP）。通过 AP 或 HRP 接触特殊的底物，杂交得以定位和定量；这些可以通过 X 射线胶片捕获发射的光子（化学发光）或在滤膜上色素沉积来完成（显色反应法检测）。

13.3.2.2　地高辛

地高辛（DIG）（Roche Applied Science）是一种来源于植物洋地黄属（*Digitalis*）的固醇类半抗原，与强心剂药物洋地黄（*Digitalis purpurea*，紫花洋地黄）来源相同。它被广泛应用于核酸标记，并支持显色反应检测和化学发光检测（Martin 等，1990）。DNA 探针是通过酶标记的，用 DIG-dUTP（DIG-11-dUTP；图 13.2）以随机引物法合成；RNA 探针是用 DIG-11-dUTP 以体外转录法合成。这些核苷酸通过一个支撑臂连接 DIG。DIG 标记的分子作杂交探针，与其他任何一类探针基本一样。寡核苷酸还可以在合成的过程中用 DIG 标记，这样就可以排除那些不合格的和效率低下的标记反应。像生物素标记一样，DIG 标记并不干扰探针的生物学活性，而且这样标记的探针在－20℃至少可以稳定保存 1 年。DIG 标记的探针在杂交后可以直接在滤膜上通过化学发光或不溶性色素沉淀物形成的方式来检测。

杂交后经过严格洗涤步骤，接着用抗体连接物（anti DIG-AP）连接，DIG 标记的探针通过酶联免疫检测法检测。如同生物素检测系统一样，光子发射或沉淀形成的发生是由碱性

❶ 是一种常用的非同位素标记核苷酸，作为 dUTP 的类似物使用。Bio-11-dUTP 表示它的核苷酸前体是 dUTP，是生物素化的 dUTP，在核苷单磷酸 11 位原子上连接一个生物素，生物素成为了探针的一部分。支持这种类型标记的技术有切口平移法（nick translation）、随机引物法和 PCR。RNA 探针可以使用 Bio-11-UTP、DIG-11-UTP（DIG 标记的）或 FL-11-UTP（FL 标记的）

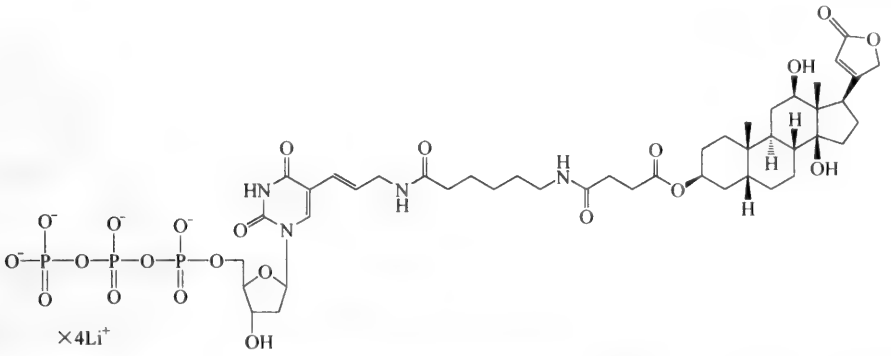


图 13.2　地高辛-11-dUTP(DIG-11-dUTP)

磷酸酶介导的底物去磷酸化所引起的，这可用多种手段检测，包括比色法或化学发光法。同样也可使用辣根过氧化物酶标记的抗体。

13.3.2.3　荧光素

几年之前，还只有荧光素（fluorescein，FL）标记的荧光标记核苷酸可以应用于 DNA 或 RNA 合成。FL-12-dUTP（图 13.3）用于标记 DNA 探针，FL-12-UTP 用于标记 RNA 探针。用这种荧光素标记的核苷酸标记探针，与生物素标记的和 DIG 标记的核苷酸所采用的方法大致相同，也可以在寡核苷酸引物合成的过程中直接掺入。杂交之后，用高亲和性抗 FL 抗体对探针进行定位，连接 AP 或 HRP 的抗体可以通过化学发光法或显色反应法检测。抗原（即荧光素）本身的荧光也可以用来监测荧光素掺入探针的情况，这样就可以估计标记反应的效率。

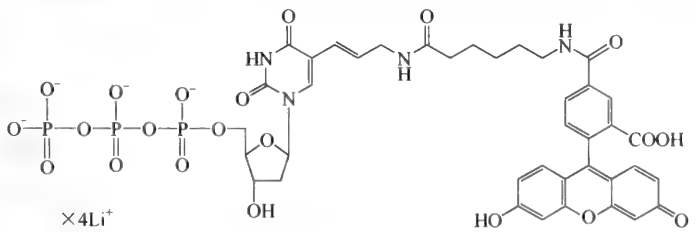


图 13.3　荧光素-12-dUTP(FL-12-dUTP)

在 FL 标记和检测系统中，虽然某些商家仍在提供前面所述的传统方法和试剂使用。但应该注意到，新一代荧光标记物和掺入这些标记物的方法已经被开发出来，并得到了广泛的应用。目前比较常用的荧光染料有 Cy3 和 Cy5。简单地说，这些染料标记 DNA 探针有两种方式：一种是直接标记，用 Cy3 或 Cy5 标记好的核苷酸，在探针合成过程中直接掺入；另一种是间接的标记方式，在 DNA 探针合成过程中，掺入氨基烯丙基 dUTP(aminoallyl-dUTP) 或氨基烯丙基 dCTP(aminoallyl-dCTP)，步反应将 Cy3 或 Cy5 连接到探针上。现在，这些荧光及其他荧光试剂标记的核苷酸通常用来合成 cDNA 进行微阵列分析（参见第 23 章）。

13.4　DNA 探针

DNA 探针种类极多。下面列举的 DNA 探针，包括事先克隆好的双链 cDNA、基因组 DNA 序列、在标记的 dNTP，以及寡核苷酸存在情况下直接以 mRNA 混合物为模板合成的

第一链 cDNA 和 PCR 产物。

① 双链 cDNA 和基因组 DNA，在标记完成后作为探针使用之前，需要变性产生相应的单链。每种标记技术的产物都要求这么做。各种 DNA 探针，包括一些已经标记好的，几乎在每个大的生物技术产品供应商都可买到。和 RNA 探针相比较，DNA 探针的一个缺点就是热动力学稳定性较低（参见第 1 章和第 14 章关于严谨性的论述），但对于实验结果来讲，这种影响常常是可以忽略的。

② 第一链 cDNA，可以在标记好的 dNTP 存在的条件下，从 mRNA 合成（或从由此富集的相关组分合成）。这样将会产生非均一探针，这种探针可以直接用来杂交。一些序列特异存在于两种或多种 RNA 群之中的一种，用异源探针确定其是否存在则特别有用。出于读者方便的考虑，有关差减杂交的讨论将写在第 21 章，因为研究者已经普遍对这种方法有所了解。

③ 寡核苷酸是人工合成的单链 DNA。在 PCR 方法发明之前，“oligos”作为标准的杂交探针已经使用很多年了。所以，PCR 扩增目的片段所用的引物，有可能很容易地被单独用作标准的核酸杂交探针。寡核苷酸可分为“长”寡聚体和“短”寡聚体，“长”寡聚体有 100 个以上的碱基，“短”寡聚体一般低于 30 个碱基。寡核苷酸的好处在于，研究者可以完全控制它的序列，因为寡核苷酸的序列是定制的。使用寡核苷酸的主要缺点和它的主要优点是相同的：因为研究者决定着寡核苷酸的序列，所以就必须知道选择什么样的序列。以寡核苷酸探针进行实验时，短链寡核苷酸的灵活性和操作自由度最大。寡核苷酸序列信息可以来源于以前保存的核酸序列数据库，对同种或不同种生物相关基因的核苷酸序列的了解，或知道目的基因所编码的蛋白质氨基酸序列。与后述方法有关的一个问题，是遗传密码的简并性，即一些氨基酸具有多种密码子。根据氨基酸序列设计寡核苷酸探针时，一个方法就是找到一段多肽，其中的氨基酸只有一个或两个可能的密码子。具有单密码子的氨基酸有甲硫氨酸和色氨酸；具有双密码子的氨基酸包括谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、半胱氨酸和赖氨酸。而且，研究者还要知道相对于其他物种，特定物种对某个密码子的偏好性。当一条具有确定序列的寡核苷酸探针信号太弱时，这可能需要同时使用多条寡核苷酸序列；研究者可以选择只用一条寡核苷酸，通过降低杂交温度和洗涤温度来弥补信号，虽然严谨性降低了。虽然这种方法降低了正确互补序列的比例，而且可能增加部分非特异性杂交，但重点在于真正的杂交事件不会检测不到。关于核酸探针的杂交细节请参考第 14 章。

④ 任何 PCR 产物都可以用作探针。标记的掺入可以在 PCR 进行中用半抗原标记的核苷酸作为底物掺入到 PCR 产物中；或者借助于引物，那些用于扩增模板的引物的 5′端事先已经做好标记。

13.4.1 DNA 探针的合成

前面已经阐述过多种标记 DNA 的方法学。简单地说，这些方法是用于产生末端标记或连续标记的探针。大多数酶介导的标记技术依赖于聚合酶的活性，聚合酶将带有标记的核苷酸掺入到产物中去。而且，*Taq* DNA 聚合酶或其他热稳定 DNA 聚合酶的使用，使得标记反应可以通过 PCR 反应在高温下进行，从而减少了探针合成过程中由聚合酶引起的偶然的点突变。当然，必须考虑 *Taq* 本身的误配率。使用校正酶和第 19 章所描述的混合酶也许会有所帮助。

下面是一些更常用技术的简单叙述。所有这些标记反应都已经商业化，可以买到相关的试剂盒，试剂盒中包括所有必需的试剂，但不包括放射性标记所需的同位素。总的来说，大多数用于产生放射性标记探针的系统也可以作为非同位素标记系统。使用放射性同位素标记时，一定要弄清同位素原子在核苷酸前体中的位置（例如 α 标记或 γ 标记）。

13.4.1.1　聚合酶链反应（PCR）法[1]

PCR 是一种很好的探针合成方法，仅仅需要极少量的模板。在合适的放射性同位素标记的或半抗原标记的核苷酸前体存在的情况下，PCR 产物在合成时就被标记好。还有一种方法，引物在合成时就做好非同位素标记，PCR 反应混合物中就不需要再加入标记好的核苷酸前体。

PCR 作为一种标记方法具有几个优点：快速、多用途、反应效率高和普遍性（因为现在大多数实验室都会用到 PCR）。此外，从微量模板合成的探针分子具有相同的长度。由于 PCR 方法制得的探针可以被连续地标记，因此，这种探针标记的程度很高。关于 PCR 反应参数的详细讨论及其他的相关策略，请参考 Dieffenbach 和 Dveksler（2003），Innis 等（1999），McPherson 和 Hames（1995），Sambrook 和 Russell（2001）。

13.4.1.2　随机引物法

随机引物法是一种引物延伸反应，在反应过程中，一些混合的短寡核苷酸序列作为引物会和热变性的双链模板进行退火（Feinberg 和 Vogelstein，1983，1984）。退火的引物最终会成为探针的一部分，因为 DNA 聚合酶Ⅰ的 Klenow 片段会从引物的 3′端进行延伸并掺入标记物。随机引物在线性 DNA 分子存在下能够很好地工作；如果试图标记共价闭合的超螺旋 DNA 分子，则会导致探针特异性反应的降低，线性 DNA 分子的探针特异性反应是共价闭合超螺旋 DNA 分子的探针特异性反应的 20～30 倍。在标记反应中，200～2000bp 长度 DNA 分子是随机引物法最好的模板，尽管模板的长度并不是决定性的因素。当用 ^{32}P 标记时，如果用 2.5～10ng 的起始模板量，随机引物法大约会产生比活力为 $(1\sim3)\times10^9$ cpm/μg 的探针。标记反应通常需要 10～30min。

13.4.1.3　切口平移法

切口平移法（Rigby 等，1977）是最老的探针标记方法之一。这种方法需要使用稀释的 DNase Ⅰ在 DNA 双链骨架上切出随机切口。极低浓度时，这种酶在模板上切出 4～5 个切口，产生了一个自由的 3′-羟基。每个切口的 3′-羟基都可以作为一个引物。接下来，DNase Ⅰ会在探针分子一端以 5′→3′方向切除原有的核酸（外切酶活性），并且用 5′→3′DNA 聚合酶活性代之以标记好的 dNTP 前体。切口平移法对于线性的和闭合环状的 DNA 分子都具有较高的效率，标记反应约需要 1h。用 ^{32}P 标记时，切口平移法会产生比活力大约为 $(3\sim5)\times10^8$ cpm/μg 的探针。

13.4.1.4　5′末端标记

与连续标记的探针不同，另一种替代方案就是在 DNA 分子的 5′末端加上一个放射性磷同位素。这种 5′末端标记的方法俗称激酶反应，它特异地将 ATP（不是 dATP）上的 γ-磷酸基团转移到经过去磷酸化的 DNA 分子的 5′-OH 上（正向反应）。这种标记反应是由 T4

[1] PCR 方法受专利保护，属于 Roche Molecular Systems，Inc. 和 F. Hoffmann-LaRoche Ltd。专利保护下，PCR 的使用是受限的。PCR 必须在经授权的热循环仪上使用。关于特殊的细节请联系 Director of Licensing，Applied Biosystems，850 Lincoln Centre Drive，Foster City，CA 94404。

多聚核苷酸激酶催化，是一种很好的标记短寡核苷酸的方法。在实验室中，做这种标记实验常犯的共同错误就是购买 α 标记的核苷酸（用于连续标记和 3′端标记的探针），而不是 γ 标记的 ATP。

正向激酶反应的效率远高于逆向的磷交换反应的效率，磷交换反应指的是替换 5′端磷酸。虽然 RNA 也能被磷酸化，但它的效率很低，以至于可以忽略不计。典型的 DNA 激酶反应需要 30min，它以产生极高比放射性（SA）的探针而广受青睐。最后，各种用于 5′端修饰的非同位素标记试剂盒可以从一些商家买到。

13.4.1.5 3′末端标记

以 3′末端标记方式进行探针合成，包括使核苷酸加到 DNA 或 RNA 的 3′末端。催化 DNA 3′末端标记最常用的酶是脱氧核苷酸末端转移酶或普通的末端转移酶。标记是在单链或双链 DNA 分子的 3′-OH 末端加上 dNTP；双链的平末端和 3′末端突出的 DNA 片段标记效率最好。由于不需要模板链，任何一种 dNTP（或 dNTP 混合物）都可以作为 3′末端的标记核苷酸；因此，末端转移酶可以认为是非模板依赖的聚合酶。这种类型的标记导致 3′末端的突出，通常只多出来 5 个或 6 个核苷酸。这些不平的末端可以根据需要用 DNA 聚合酶Ⅰ的 Klenow 片段补平，以用于平末端连接，只是这种方法有可能使标记损失。*Taq* DNA 聚合酶像其他没有校正功能的聚合酶一样，也有末端转移酶的活性；众所周知，*Taq* DNA 聚合酶会在它合成的每一条多聚核苷酸链的 3′末端加一个多余的核苷酸，这个核苷酸通常是“A”。因此，用 *Taq* DNA 聚合酶做 PCR 时，其双链产物每一条链的 3′末端都会有一个多余的核苷酸“A”。

当标记短寡核苷酸时，这种标记方法的缺点就显现出来了。附加的核苷酸改变了分子的长度，这可能会改变寡核苷酸的特异性和热动力学特性。如果要通过 3′端加尾的方式标记一段寡核苷酸，强烈建议使用 dATP，因为 A ∶∶ T 碱基对的热稳定性要比 G ∶∶∶ C 碱基对的热稳定性低。

13.4.1.6 直接的酶标记

前面讲到的每一种标记 DNA 的技术，都可以使已标记核苷酸替换或附加到探针上。相对于这些不错的技术，一种新的支持化学发光检测的探针标记技术被开发出来，成为一个可行的替代方案。这种方法叫作直接的酶标记（ECL System；Amersham Biosciences，Piscataway，NJ），它通过戊二醛直接将酶交联到热变性的 DNA 骨架上，这种酶可以产生化学发光。这种方法具有极高的标记效率，只需要 20min 就可以完成对探针的标记。此外，也不需要后续的步骤来除去没有掺入的标记物。简单地说，双链 DNA 先煮沸 5min，然后在冰上迅速冷却，以最大程度地减少复性；然后戊二醛将修饰的 HRP 连接到单链 DNA 上。因为标记完成的探针不能再煮沸，而且变性的 DNA 在相对较短的时间内会重新配对，所以，应当只标记所需要量的探针，而且标记好后，应立即将探针加入到杂交混合液中。因为在整个杂交和后续的洗涤步骤（参见第 14 章）中，酶是一直存在的，其严谨度的调整必须通过离子强度的调节和去稳定剂（如 SDS 和尿素）的使用来完成，而不能升高温度。

13.5 反义 RNA 探针

RNA 探针作为杂交工具仍然很常用，因为它们具有几个重要的优点。这些探针是通过体外转录的方式合成，而且几乎在所有的应用中都可以替代 DNA 探针。在转录模板的结构中，用来转录的 cDNA 两端连接了两个不同来源的噬菌体 RNA 聚合酶启动子。这两个启动

子位于多克隆限制性内切酶位点的两侧，而且在相反的方向。最常见的结构是 SP6 和 T7 或 T3 噬菌体 RNA 聚合酶启动子（图 13.4）。在转录反应启动之前，转录片段通过适当的限制性内切酶线性化，这可以以最大的效率转录出具有相同长度和连续标记的探针（图 13.5）。

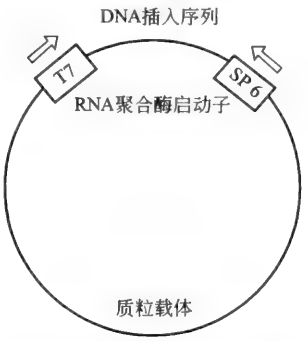


图 13.4　在支持体外转录的质粒结构中，典型的双 RNA 聚合酶启动子的转录方向。转录模板位于两个启动子之间，模板通常是 cDNA。起始转录之前，质粒结构进行线性化

从同一个模板结构的正义链和反义链转录出的产物，是构成所需要的 RNA 探针的不可或缺的部分。反义 RNA 和 mRNA 是互补的，因此可以和 mRNA 进行碱基配对。在转录研究中，反义 RNA 除了可以用作探针外，还可以在翻译水平抑制基因表达，这是由于形成了不能翻译的双链 RNA 结构——这是 RNA 干扰（RNAi）的核心。很早以前，实验显示，反义 RNA 在体外哺乳动物系统中可以调控基因表达（Nishikrua 和 Murray，1987），同样的结果也发生在噬菌体、细菌和植物（Green 等，1986）以及其他动物（Knecht 和 Loomis，1987）中。

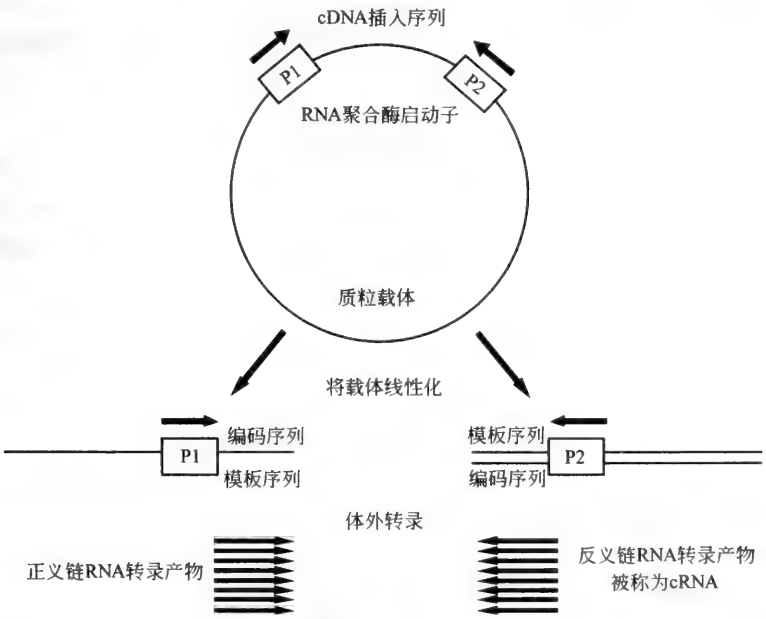


图 13.5　体外转录之前，模板必须线性化，这有利于提高转录效率，可以转录出大量的具有相同长度的探针。请注意，启动子的位置决定了转录产物是正义 RNA（sense RNA）还是反义 RNA（antisense RNA）。如果插入的 cDNA 的方向是不知道的，那么就必须弄清哪个启动子转录哪种产物

例如，某个研究者想确定哪种细胞正在合成 *N-myc* mRNA，由此描绘出病鼠小脑的组织病理学特征。这种检测要准备一个组织切片进行原位杂交[1]。因为在这个研究中其目标是

[1] 对原位杂交的很好探讨，请参考 Chesselet（1990），Wilkinson（1992）和 Nuovo（1994）。

mRNA，所以需要使用反义 RNA 做探针。当反义 RNA 和 mRNA 杂交时，会具有较高的热动力学稳定性，这就允许在严谨的条件下进行分析。正义 RNA 探针（和这个 mRNA 具有相同序列的探针）也需要转录出来，作为负对照来估计非特异性杂交的程度。一种方法是，在 DIG 标记的 UTP（Roche Applied Science，Indianapolis，IN）或 FL 标记的 UTP（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ）存在的条件下，将正义 RNA 探针和反义 RNA 探针合成出来，接下来通过显色反应法来检测。色素沉淀的分布通过光学显微镜来检测，并不需要同位素。弄清反义 RNA 在组织切片上的分布后，就可以用反义 RNA 通过 Northern 印迹结合化学发光检测来共同确定 *N-myc* mRNA 的定性信息。

13.5.1 RNA 探针的特点

① RNA 探针是单链的。这种探针在使用前不需要煮沸，但稍微加热一下可以打乱可能形成的分子内碱基配对。

② 所有 RNA 探针分子都可以用来杂交。因为它们是单链的，所以不会像 DNA 那样发生复性反应而降低探针的有效浓度，虽然也可能发生分子内碱基配对。

③ RNA 探针在转录时是连续标记的，因此生成的探针掺入了大量的标记物。

④ 与 DNA 探针相比较，RNA 探针在与 DNA 或 RNA 靶分子杂交时，显示出了更高的热动力学稳定性。

⑤ RNA 探针是通过体外转录的方法从同一模板合成，因此所有的探针分子的长度是一样的。

⑥ 一次体外转录反应就可以合成大量 RAN 探针[1]。

⑦ 构建转录模板时，待转录的 cDNA 两端一般都有高效的噬菌体 RNA 聚合酶启动子。或者使用一个好的载体，在它的多克隆位点两端各有一个转录方向相反的 RAN 聚合酶启动子。这样根据需要，正义 RNA 探针和反义 RNA 探针都可以转录出来。最常用的是 SP6 和 T7 或 T3 噬菌体 RNA 聚合酶启动子。

⑧ 实验显示，SP6 和 T7 或 T3 噬菌体 RNA 聚合酶启动子并不被交叉识别。因此，转录反应从其中一个启动子开始时，另一个启动子不会启动相反方向的转录。

⑨ 用来合成 RNA 探针的质粒，在开始体外转录之前一定要将其线性化。

⑩ 和处理其他 RNA 一样，体外转录 RNA 探针一定要用无 RNase 的试剂，否则会导致转录探针的迅速降解。

⑪ RNA 探针经常会产生不能接受的高亮度背景，因此当杂交完成后，通常会用 RNase A 和 RNase T_1 将所有探针消化掉。这是为了除去所有没有形成双链的探针。

⑫ 放射性同位素标记的 RNA 探针比活力极高，导致它们在长时间储存时会因放射照射而降解。

13.5.2 RNA 探针的合成

和各种 DNA 探针的合成方法相比较，标记的 RNA 探针只有一种可靠的合成方法，那就是体外转录。因为 RNA 容易降解，而且对 RNase 的作用很敏感，所以处理 RNA 探针时，必须像处理其他 RNA 时那样小心。下面简单地介绍了一下 RNA 的标记技术。RNA 体

[1] 有文章（Krieg 和 Melton，1987）报道，通过降低标准的反应温度，可以提高全长转录产物的比例。

外转录系统已经有了试剂盒，从很多商家都可以买到，而且除了同位素外，所有必需试剂都已包括在内。这些系统在没有同位素时也可以很好地工作。

13.5.2.1　体外转录

合成 RNA 探针时，体外转录是唯一可靠的方法。大量具有相同长度的高效标记探针可以从连接有 RNA 启动子的 DNA 序列中转录出来。有一个很好的方法，就是将需要转录的 DNA 序列克隆到具有相反转录方向的两个启动子之间。这样就可以将 DNA 的两条链都转录出来，产生正义 RNA 和反义 RNA 用作杂交反应。现在已有多种有用的 RNA 探针克隆载体（Promega，Madison，WI），在进行 RNA 探针体外转录实验时，通常是非常好用的。

正如在体内时一样，RNA 探针的体外转录是由 NTP 前体的聚合完成的。转录产物的延长是通过核苷单磷酸添加到探针初生产物的骨架上来完成的。和所有的连续标记探针一样，RNA 探针标记所需要的 [^{32}P]UTP 同位素是标记在 α 位上。因为探针的标记是在合成时完成，所以标记掺入的水平非常高。

13.5.2.2　5′末端标记

另一种方法不是通过体外转录产生连续标记的 RNA 探针，而是在探针分子的 5′末端标记上一个放射性同位素磷。5′末端标记法俗称激酶反应。就是特异地将 ATP 上的 γ-磷转移到 RNA 或 DNA 的 5′-OH 上（正向反应）。相对于替换 5′末端磷酸的交换反应来说，正向的激酶反应具有更高的效率。这一反应由 T4 多聚核苷酸激酶来催化。用这个方法标记 DNA 比标记 RNA 效率更高，这也是它不常用作标记 RNA 的一个原因。

想通过此法标记的实验室常犯的共同错误就是购买 α 标记的核苷酸（用作连续标记和 3′末端标记），而不是所需要的 γ 标记 ATP。

13.5.2.3　3′末端标记

RNA 也可以用 poly(A) 聚合酶进行 3′末端标记。这个酶在生物体内催化细胞核内 hnRNA 的多聚腺苷化，把 AMP 掺入 3′末端。同位素需要 α 标记的 ATP 前体。除了在 RNA 探针合成反应中的用处，poly(A) 聚合酶还参与无 poly(A) 的 mRNA 或其他 RNA 的多聚腺苷化，以支持 oligo(dT) 引物介导的 cDNA 合成。虽然这种标记方法也可以，但在实际上它只是合成探针时的最后选择。

13.6　探针的纯化

和大多数标记技术一样，没有掺入的标记物必须从标记好的探针中分离出来。特别是使用同位素时，如果没有做好这一步，通常会导致背景高到无法接受的程度。有三种基本的方法可以纯化探针。为了获得最佳结果，必须按照标记系统附带的商家建议去做。

第一种方法是用乙醇沉淀探针，这种情况下，没有掺入的标记物仍然留在上清液中。这是一种有效的纯化长探针的方法，但沉淀短的寡核苷酸就比较困难，特别是核酸量很少的时候。沉淀探针要同时加入盐和乙醇（参见第 5 章，表 5.2），一般加入 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积的 95%乙醇。

第二种常用的探针纯化方法就是凝胶过滤，或其修改方案。一个流行的方法是制作或购买离心分离柱（Sambrook 和 Russell，2001），其中含有 1ml 用注射器压紧的交联葡聚糖（Sephadex）（Amersham Biosciences）。Sephadex G-50 用来纯化长的探针，Sephadex G-25 用来纯化短的寡核苷酸。离心柱层析法（spun-column chromatography）是一种广受褒奖的

凝胶过滤方法，只需在 1000×g～1200×g 的离心力下离心约 4min 即可；探针很快被洗脱出来，而没有掺入的核苷酸则留在柱子内。这种方法往往可除去超过 95%的未掺入标记物。凝胶过滤纯化探针在各种标记方法中都被广泛使用，包括同位素和非同位素的。

第三种常用的探针纯化方法，包括使用各种浓缩材料或吸附材料纯化探针。这些材料有 Elutip-d 微过滤柱（Schleicher & Schuell，Keene，NH）、Ultrafree 过滤组合（Ultrafree filtration units）和 Centricon 系列（Centricon devices）（Millipore，Billerica，MA）。与传统的柱层析和乙醇沉淀法相比较，这类探针纯化方法具有快速、方便的优点。因为这些材料是一次性的，所以将放射标记废物的污染降到了最低。

13.7 探针的保存

只有保持足够剩余放射活性的同位素标记探针才是有用的。一般来说，放射标记的探针在标记后应尽可能立即使用。探针的放射性分解作用，特别是那些具有极高比活力的探针，随着探针保存时间的延长，问题益发严重。使用前，探针要保存在－20℃或－80℃，避免反复冻融。

非同位素标记的探针需要根据标记后储存和操作的建议来进行。生物素标记的探针、地高辛标记的探针和荧光素标记的探针，可在－20℃下保存 1 年以上。在一些实验室，花一整天的时间合成非同位素标记的探针，以供后面数周甚至数月之用。一旦需要做杂交实验，马上就有探针可用。除非即将需要使用探针，否则不要将其变性。

13.8 内源参照物

不同研究者的技术不一致以及日常操作误差，常常导致科研工作中的错误。这些错误在每个层面上都会发生，从个人的实验技术到数据分析。为了至少在一个方面排除转录分析中发生错误的可能性，一个通用的方法就是测定内源参照物（internal control）或内源标准（endogenous standard），它们的表达情况不会因实验操作的不同而变化。它们通常被称为参照（reference）或看家基因（housekeeping genes）。这些看家基因的转录产物，可以使两个或两个以上的样品标准化（有意义的比较）；在目的基因分析之前或之后，在同一个印迹膜上或同一样品系列中，要对看家基因进行分析。因为 Northern 分析法的原理所致，使得这种技术普遍缺乏灵敏度，因而需要多做重复。通过核酸酶保护实验（参见第 16 章）、反转录聚合酶链反应（RT PCR）（参见第 19 章）和其他的定量 PCR 技术（参见第 20 章）都可以获得很高灵敏度的数据。无论使用什么方法，看家基因的分析是必要的。

然而，很多通用的组成型表达的看家基因本身受细胞类型的影响而改变。自然也没有哪一种内部对照可以适合所有情况。下面列出了部分常用的参照基因。

① β肌动蛋白（β actin）是一种中等丰度的、组成型表达的转录产物，其同源物在所有类型的细胞中都有表达（Kinoshita 等，1992）。它是历史上第一个用作对照的转录产物，现在仍然经常使用。但是，很多文章显示这个基因的表达会根据不同的外部刺激和内部状态而发生变化（Leof 等，1986；de Leeuw 等，1989；Dodge 等，1990；Solomon 等，1991；Spanakis，1993）

② 甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）具有中等丰度的转录产物，编码了糖酵解途径中

的一个关键酶。GAPDH 表达的转录产物作为参照基因使用很广，包括本实验室也在使用。和 β-actin 的情况一样，GAPDH 基因的表达也容易受到各种外部条件的影响（Alexander 等，1990；Mansur 等，1993；Bhatia 等，1994）。

③ 亲环蛋白（cyclophilin）是一种参与肽键异构化的蛋白质，其基因具有高度的保守性，在细胞质中它的 RNA 转录产物为中等丰度。虽然其转录产物用作对照，但也发现了亲环蛋白 mRNA 表达的变化（Danielson 等，1988；Haendler 和 Hofer，1995）。

④ 组蛋白（histones）是核小体（nucleosome）形成所必需的一类家族蛋白。它具有高丰度的转录产物，经常作为看家基因被检测（Robert 等，2002）。

⑤ 其他的基因，包括纤粘连蛋白（高丰度转录产物，存在于细胞外基质）、转铁蛋白受体（中低丰度表达，铁的摄取）、泛肽（一种小蛋白质，介导其他蛋白质经由蛋白酶体降解）、核纤层蛋白和微管蛋白（高丰度转录产物，微管的构成单元）的 mRNA 被广泛用作对照。这些基因表达的蛋白质产物，在细胞中都有其特定的功能。虽然总是有些例外，但总的来说，这些基因的表达在 mRNA 水平波动的可能性较小。但是，第一件事是要进行检测。

⑥ 28S rRNA 和 18S rRNA 是核糖体基因转录后调节的产物，含量极丰，其转录产物几乎恒定不变，经常用作内源参照物（de Leeuw 等，1989；Bonini 和 Hofmann，1991）。这些转录产物是成熟的核糖体的必需成分。笔者认为，28S rRNA 和 18S rRNA 作为电泳加样量的对照，比作为基因的表达对照更好，因为它们是 RNA 聚合酶Ⅰ的产物，而 mRNA 和它的未剪接前体 hnRNA 是由 RNA 聚合酶Ⅱ转录出来的。这些 RNA 聚合酶对不同的生物异源物（xenobiotics）具有不同的敏感性。所以，在实验操作过程中，很可能会引起 RNA 聚合酶Ⅱ转录的完全抑制，然而 RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ可能继续以接近正常的水平进行转录。当然，相反的情况也是有可能发生的。

⑦ 线粒体 16S rRNA，中等丰度，存在于线粒体中。与细胞质中的 16S rRNA 相比，较少用作内源参照物。这些线粒体基因的表达受实验操作影响的程度远远低于位于细胞核中的 rRNA 基因（Tepper 等，1992），但它是核糖体基因产物而不是 mRNA，所以也应当考虑第⑥条所提到的问题。

⑧ 转移 RNA（tRNA）有多种高丰度转录产物，在翻译过程中，它们将氨基酸转运到核糖体。有时会用 tRNA 特异性探针测量 tRNA 的总量，作为加样量的对照。tRNA 是由 RNA 聚合酶Ⅲ转录出来的，所以更适合用作加样量的对照，而不是基因表达的对照，理由同第⑥[1]条所述。

人为加入一定量的体外转录的 RNA 样品作对照，可能也很有用。这种人工转录产物，通常和至少一种实验要分析的转录产物有关，然而是截短的，所以它可以为探针所识别，与目的转录本有着相似的热稳定性；而且它在电泳结果上显示出不同的条带，这将确保对照和目的片段可以分开。沿着相同的思路，如果 RNA 在下游应用中被用来做 RT-PCR 的话，导入一个真正的 RNA 样品（例如兔球蛋白 mRNA）可能是特别有用的。思路是这样的，兔球蛋白转录产物会被反转录出来，并通过 PCR 进行扩增，在理想情况下，其反转录和扩增效率与样品中其他 RNA 是相同的。因为加入到每份样品中的球蛋白 mRNA 的精确含量是已知的，所以通过比较球蛋白特异的 PCR 扩增产物，就可以对每一份实验样品进行标准化，

[1] 原书为“⑤”，译者认为有误，改为“⑥”。——译者注

并进而推知每管中反转录反应的效率。诸如此类的方法，常常可以发现由于实验操作的原因引起实验结果的波动。此外，通过添加不同浓度的外源 RNA 到不同的样品中，人们可以勾画出对照条带亮度与加入量之间的相关标准曲线，用于与目的条带亮度相比较。关于这种方法在 RT-PCR 定量上应用的细节，请参考第 19 章和第 20 章。

13.9 参考文献

Alexander, M., Denaro, M., Galli, R., Kahn, B., and Nasrin, N. (1990). Tissue-specific gene regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene by insulin correlates with the induction of an insulin-sensitive transcription factor during differentiation of 3T3 adipocytes. *In* "Obesity: Toward a Molecular Approach," (G. Bray, D. Ricquire, and B. Spiegleman, Eds.) pp. 247–261. A. R. Liss, New York.

Bhatia, P., Taylor, W., Greenberg, A., and Wright, J. (1994). Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and 28S ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* **216,** 223.

Bonini, J. A., and Hofmann, C. (1991). A rapid, accurate nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *BioTechniques* **11,** 708.

Chesselet, M. F. (1990). "*In Situ* Hybridization Histochemistry." CRC Press, Boca Raton. FL.

Danielson, P., Forss-Petter, S., Brow, M., Calavette, L., Douglas, J., Milner, R., and Sutcliffe, J. (1988). A cDNA clone of the rate mRNA encoding cyclophilin. *DNA* **7,** 261.

de Leeuw, W. J., Slagboom, P., and Vijg, J. (1989). Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Res.* **17,** 10137.

Dieffenbach, C., and Dveksler, G. S. (Eds.). (2003). "PCR Primer," 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Dodge, G. R., Kovalszky, I., Hassell, J. R., and Iozzo, R. V. (1990). Transforming growth factor β alters the expression of heparin sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. J. *Biol. Chem.* **265,** 18023.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132,** 6.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137,** 266.

Green, P., Pines, O., and Inouye, M. (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **55,** 569.

Haendler, B., and Hofer, E. (1995). Characterization of the human cyclophilin gene and of related pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190,** 477.

Hoffman, K., and Finn, F. M. (1985). Receptor affinity chromatography based on the avidin-biotin interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **447,** 359.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., and Sninsky, J. J. (1999). "PCR Applications: Protocols for Functional Genomics". Academic Press, San Diego, CA.

Kinoshita, T., Imamura, J., Nagai, H., and Shimotohno, K. (1992). Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **206,** 231.

Knecht, D. A., and Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236,** 1081.

Krieg, P. A., and Melton, D. A. (1987). *In vitro* synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **155,** 397.

Leary, J. J., Brigati, D. J., and Ward, D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80,** 4045.

Leof, E. B., Proper, J. A., Getz, M. J., and Moses, H. I. (1986). Transforming growth factor type beta regulation of actin mRNA *J. Cell Physiol.* **127,** 83.

Mansur, N., Meyer-Siegler, K., Wurzer, J., and Sirover, M. (1993). Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Res.* **4,** 993.

Martin, R., Hoover, C., Grimme, S., Grogan, C., Holtke, J., and Kessler, C. (1990). A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechniques* **9,** 762.

McPherson, M. J., and Hames, B. D. (Eds.). (1995). "PCR 2: A Practical Approach." IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England.

Nishikura, K., and Murray, J. M. (1987). Antisense RNA of proto-oncogene *c-fos* blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 639.

Nuovo, G. J. (1994). "PCR *in situ* Hybridization." Raven Press. New York.

Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Paul, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. *Mol. Biol.* **113,** 237.

Robert, C., McGraw, S., Massicotte, L., Parvetoni, M., Gandolfi, F., and Sirad, M. A. (2002). Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* **67,** 1465.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Soloman, D. H., O'Driscoll, K., Sosne, G., Weinstein, I. B., and Cayre, Y. E. (1991). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced regulation of protein kinase C gene expression during HL-60 cell differentiation. *Cell Growth Differ.* **2,** 187.

Spanakis, E. (1993). Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res.* **16,** 3809.

Tepper, C. G., Pater, M. M., Pater, A., Xu, H., and Studzinski, P. (1992). Mitochondrial nucleic acids as internal standards for blot hybridization analyses. *Anal. Biochem.* **203,** 127.

Wilchek, M., and Bayer, E. A. (1984). The avidin-biotin complex in immunology. *Immunol. Today* **5(2),** 39.

Wilkinson, D. G. (Ed.). (1992). "*In Situ* Hybridization: A Practical Approach." IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England.

Zagursky, R. J., Conway, P. S., and Kashdan, M. A. (1991). Use of ^{33}P for Sanger DNA sequencing. *BioTechniques* **11,** 36.

（郭立涛译；陈祥龙校）

第 14 章　核酸杂交应用

14.1　基本原理

1961 年 Marmur 和 Doty 第一次具体描述了核酸杂交的过程，而其调控的参数成为分子生物学研究中最复杂最难以理解的部分。分子杂交的核心，就是两个互补的寡核苷酸以反向碱基配对的方式形成双链分子。这种现象也称为双螺旋形成。

在有利于核酸杂交的条件下，参与构成双螺旋的链有它们特定的名称。探针链，正如其名字所暗示的一样，它们通常能够携带某类标记，因而可以在杂交结束后对探针进行定位和定量分析。另一条链通常称为靶链，要么固相化于固相支持物，以利于以滤膜为基础的分析（如 Northern 分析或斑点印迹分析）；要么重悬于缓冲液中，自由参与液相杂交（如 S1 核酸酶分析）。

举例：一个组织样品抽提的总 RNA 中含有上千种不同的 mRNA。特定的研究目标可能是确定活体解剖得到的细胞中的 *c-myc* 转录本。为了解决此问题，需要一个合适的互补的探针，也就是说，一个只能和 *c-myc* 转录本杂交的探针。此探针可以是一段 cDNA 序列、一段基因组序列、一段反义 RNA 序列或一个寡核苷酸。*c-myc* 特异的探针可以用 ^{32}P 标记，以利于放射自显影检测；或用第 13 章介绍的任何一项支持化学发光检测的探针标记技术，如用半抗原（hapten）标记探针或直接用酶标记探针。如果杂交严谨度足够的话，*c-myc* 探针分子就只能和互补的 *c-myc* 转录本杂交，而相应的该转录本是此特定探针的靶序列。正确操作时，探针物质的量（mol）大大过量，所有互补的靶链可以和探针全部互补配对。同样可以研究其他基因的表达情况，所需要的只是不同的目的基因的探针。实际操作中，通常采取的策略就是将含有 RNA 样品的滤膜多次杂交：经过第一轮杂交和检测，通过严格的洗涤去除探针，然后同一张滤膜用完全不同的、可检测另一种 mRNA 的探针杂交。

杂交结束后，严格洗涤滤膜去除没有结合的剩余探针。杂交的量级计算方式和实验初期使用的探针标记方法一样，要么通过放射自显影，要么通过化学发光技术。而且为了在 X 射线胶片上永久记录分子量标准的位置，实验者可能希望制备能和分子量标准杂交的少量探针，因为这样可以更好地检测目的核酸。该方法避免了猜测相对于实验样品的分子量标准的相对位置。

14.2　影响杂交动力学和特异性的因素

最早的 Southern 印迹（Southern，1975）描述了 DNA 探针和其相应的 DNA 靶序列的杂交过程。由此得到的 DNA：DNA 双螺旋分子，在热力学方面没有由 RNA 靶或 RNA 探

针单独或同时参与杂交得到的 DNA：RNA 及 RNA：RNA 双螺旋分子稳定。关键在于杂交时和杂交后的洗涤的严谨度，其严谨度要根据探针和靶分子之间形成的双螺旋体（DNA：DNA/DNA：RNA/RNA：RNA）的化学性质来调整。

举例：一个研究者要用人类互补 DNA(cDNA) 探针检测斑马库。由于序列之间的差异性，斑马基因组中可能不存在人类的有关基因。或者斑马基因组中存在人类保守度低的基因序列，但是因为序列差异大，用于人类基因的探针在严格的杂交条件下也许不能和靶分子杂交。要鉴定斑马基因组序列中是否存在与人类 cDNA 探针互补的序列，又或者是通过 Northern 分析或 Southern 分析进一步鉴定这些相关序列，那么就必须降低杂交条件的严谨度，如在后面章节所描述的，需要依据部分互补的原理来杂交。

影响探针杂交的速度、特异性、保真度和有效利用率的因素，包括以下几点：温度、离子强度（主要是 Na^+）、pH、有机溶剂（如甲酰胺）、探针鸟嘌呤和胞嘧啶的（G+C）含量、探针长度、探针浓度、探针的复杂度（杂交中不同探针序列的总体长度）、探针与靶序列之间的互补程度、错配率和体系的黏稠度等。影响杂交的因素很多，并不局限于以上这些因素。认识这一点是重要的，每个变量的影响也取决于单链探针与靶分子所处的状态：①溶液杂交，探针与靶分子在特异杂交混合液中随机移动，如核酸酶保护实验和聚合酶链反应(PCR)；②固相杂交，靶序列固相化在固相支持物上，如 Northern 印迹。

14.2.1　温度

在促进或阻止杂交的所有变量中，体系的温度可能是最常考虑也是最易操作的变量。通过计算得到的解链温度（T_m），不仅可以衡量杂交物的稳定性，还可以预测杂交到何种程度。在分子杂交中，常认为 T_m 是一个平衡点。T_m 是指 50%的分子杂交，余下 50%的分子仍解离成单链组分时的温度。也就是说在 T_m 时，每形成一个新的双链，另一个双链正在解离。监测这种现象的一个最常用的指标，就是 DNA 在 260nm 波长处的紫外吸光值变化。当双链 DNA 开始变性成其单链组分时，伴随着吸光值的增加，并与解链程度有一定的比例关系，称为增色效应。这种检测通常可以鉴定双链分子的热力学稳定性。

对于长探针而言，杂交的最大速率是在低于计算得到的 T_m 值 15～20℃温度下观测到的。盐溶液中，相应的杂交温度大约在 60～65℃。后面会叙及甲酰胺加入对该参数的影响。用针对一种核酸的探针去杂交另一种核酸时，如两者的解链温度相差 1℃，那么相应地两种核酸序列的差异也相差 1%（Bonner 等，1973）。甲酰胺的加入，通常会在不改变其严谨度的情况下，大幅度降低杂交温度。

最后，因为在探针的 T_m 时，只有 50%的分子形成双链，而研究者显然并不希望仅 50%的靶分子杂交。所以实际操作中的杂交温度通常至少低于 T_m 值 5℃，可能更低。如果有理由认为探针与靶序列不严格配对的话，这样做特别正确。研究者想要的是与探针完全配对。但实际情况是，在洗涤步骤，即在杂交过程后，开始检测前，研究者过度控制了严谨度。因此，在某些情况下，在室温下进行杂交是极其有效的；只要滤膜在探针检测前正确洗涤，相对低温度的杂交对结果不会产生负面影响。

14.2.2　离子强度

增加或减少杂交缓冲液中的盐浓度，将会大大影响实验的严谨度。通常杂交速度随着盐浓度的增加而增加，1.2mol/L NaCl 时杂交速度趋于稳定；盐浓度每变化 10 倍，核酸双链

的 T_m 值大约变化 16℃（Britten 和 Davidson，1985）。而且由于二价阳离子在低浓度时比一价阳离子具更大的影响力，所以避免使用乙烯-双（氧乙烯）四乙酸［ethylene-bis（oxyethylenenitrilo）tetraacetic acid，EGTA］类的螯合试剂，最好使用乙二胺四乙酸（EDTA）。经典的杂交缓冲液中，离子强度一般为 0.1～1.0mol/L Na^+。

14.2.3 pH

环境的 pH 也是广泛影响双链分子稳定性的因素之一。许多杂交反应都是在接近中性 pH 的环境下进行，因为碱性缓冲液会促进双链解聚，而高酸性缓冲液能使探针和靶分子脱嘌呤化。通常，pH 是核酸杂交中最少调整的一个变量。

14.2.4 探针长度

根据表达公式 $D=500/L$，探针的长度直接影响探针 T_m 的计算（双螺旋体的稳定性）。式中，D 指的是 T_m 值的减少（摄氏度）；L 指的是实际参与双链形成的碱基数目（Britten 和 Davidson，1985），也就是探针的长度。探针越短，杂交越容易迅速发生，探针越有识别力，如短的寡核苷酸可以区别仅一个碱基差异的靶序列。作为常规，探针越短，其他变量越有影响力。

14.2.5 探针浓度

研究者对于加入杂交缓冲液中的探针数量，也经过慎重的考虑。简而言之，就是随着探针浓度的增加，正向杂交动力学也随之增加。因此，探针浓度越高，越能加速杂交过程，这样就减少了饱和所有靶序列所需的时间。这点在寡核苷酸作为探针时尤其如此。不过，过量的探针也会导致非特异性杂交——想象一下 PCR 中，引物过多时会发生什么样的事。

为了得到合适的探针浓度，必须考虑两个变量：①检测方法，也就是说，同位素或非同位素探针；②靶的丰度，如单拷贝基因或低丰度转录本。所需探针的数量必须依据表 14.1 的方针、探针的质量或探针的特异性（如果是同位素标记的话）。如果使用过多的探针，在杂交后洗涤过程中，实验的严谨度就比较容易操作。

表 14.1 推荐使用的核酸探针浓度

项　目	探针质量/(ng/ml)	探针活性/(cpm/ml)
同位素标记		
单拷贝基因或低丰度转录物	20～50	10^6
多拷贝基因或高丰度转录物	5～20	10^5
寡核苷酸探针	1～5	$>10^4$
非同位素标记		
单拷贝基因或低丰度转录物	50～75	没有应用
多拷贝基因或高丰度转录物	20～50	没有应用
寡核苷酸探针	5～10	没有应用

注：这里的数值是指每毫升的杂交液。探针浓度由实际加入量或标记掺入来表示。尽管非同位素标记探针的敏感度经常可以与同位素标记相比较，但是前者在每毫升的杂交液中加入的探针量通常更大。

14.2.6 (G+C) 含量

组分分子的碱基复杂性大大影响杂合物分子的稳定性。由于鸟嘌呤（G）和胞嘧啶（C）间可形成三个氢键，富含 GC 的双链在热力学上比富含腺嘌呤尿嘧啶（AT）的双链稳定，

因为后者只能形成两个氢键。探针长度越短，(G+C) 含量越显得重要。如下列公式强调了在杂交和 PCR 实验中设计寡核苷酸探针时，(G+C) 含量在双链稳定性方面的重要性。

$$T_m = 0.41 \times (\text{G+C})\text{含量} + 69.3$$

式中　(G+C) 含量——指双链中鸟嘌呤残基和胞嘧啶残基的百分比（Matmur 和 Doty，1961）。

14.2.7　错配

许多推荐的杂交条件，包括商用滤膜和分子生物学试剂盒推荐的条件，都可获得完美或接近完美的探针与靶序列间的配对。已证实完全配对的探针在严格的杂交条件下，与靶分子可以迅速形成双链。错配指的是，探针上某位碱基不能与靶分子上相应碱基配对形成氢键。也就是说，探针上的大部分或全部其他碱基都能和靶分子配对。错配可能是待研究生物体的点突变，也可能是自然发生的多态现象，又或者是探针设计中的错误。错配会阻碍杂交速度，而且在足够高的温度下，错配会阻止杂交的进行。探针长度越长（长于 1kb），在标准杂交条件❶下，错配的效果一般不太引人注意。探针长度越短，尤其当寡核苷酸作为探针或引物时，错配导致的杂交结果越显著。一般通过降低杂交温度来降低杂交的严谨度，从而促进错配探针与靶序列之间的杂交。杂交温度越低于探针的 T_m 值，探针与靶序列之间的错配越可以容忍。但是序列依赖的温度低到一定程度时，随机杂交的可能性也增大。

14.2.8　探针的复杂性

对杂交而言，探针的复杂度，指的是在杂交中能和互补靶序列碱基配对的不同探针序列的长度。在许多情况下，只使用一种类型的探针（比如，Northern 分析时只用 *c-myc* 探针来检测细胞内 *c-myc* mRNA 的丰度）。然而使用简并寡核苷酸探针时，该探针里含有不止一种的探针序列（可能是因为靶序列不明确），探针越是复杂，正确的寡核苷酸探针浓度越小，杂交动力学也随之变慢。对于这种情况，可以把 T_m 相近的探针序列归为一类，然后进行多次杂交，在适合一个特定库或批次里的探针的温度下进行严格洗涤。

14.2.9　黏性

黏性对核酸杂交影响的最初研究表明（Subirana 和 Doty，1966；Thrower 和 Peacocke，1968；Chang 等，1974），当黏度（因蔗糖和乙二醇的存在）增加时，复性速度变慢。许多较老的杂交缓冲液成分中的一个普通成分——阴离子葡萄糖硫酸盐（Wahl 等，1979；Lederman，1981），也会增加环境的黏度。杂交速度的增大，是因为葡萄糖硫酸盐占据了杂交缓冲液的较大部分物理空间，迫使探针占据一个较小的体积，从而增大了探针的有效浓度。在众多的杂交方案中，加入 Denhardt 溶液❷（Denhart，1966）也会产生类似的现象。该溶液是葡萄糖硫酸盐较好的替代品，因为它能减轻许多杂交方案中葡萄糖硫酸盐的加入所引起的相关严重的环境问题。

---

❶ 标准杂交条件可由各式各样的用于不同目的的预杂交或多种杂交缓冲液中的部分组成，而且经常需要孵育过夜。“标准”是指探针长度的影响并不是一个主要的变量，以及因为错配而杂交速度的降低可被相对长时间的杂交所抵消。探针的长度缩短，杂交条件就会变得没有那么“典型”了。

❷ 100×Denhardt 溶液：2% Ficoll 400（聚糖体），2% 聚乙烯吡咯烷酮（PVP），2%BSA（见组分 V）。

14.2.10 甲酰胺

甲酰胺（$HCONH_2$）由于它可以干扰氢键的形成，因而它可以降低双链分子的稳定性。因此，甲酰胺的加入会以线性方式降低 T_m 值（和杂交温度）。每加入 1%的甲酰胺，T_m 降低约 0.75～1.0℃。根据（G+C）含量、水合作用和螺旋形成，每加入 1mol 的甲酰胺，T_m 减少 2.4～2.9℃（Blake 和 Delcourt，1996）。因此，一般都是在 42℃含 50%甲酰胺的杂交缓冲液中进行杂交实验；这对于一个典型的探针而言，大约是在 T_m－20℃的温度下进行杂交，这样有利于探针与靶分子间最大程度地配对，而不需要改变杂交的严谨度。在含有甲酰胺的缓冲液中进行 RNA 分析，也能够增加探针分子的有效寿命，因为后者具有热不稳定性。

此外，读者应该注意到，现在已经有一种新的不含甲酰胺的杂交缓冲液，这种缓冲液可以大大加快正向杂交的动力学。而且，许多的预备试剂中含有表面活性剂，这种试剂可以阻止探针和滤膜结合，这样就减少了背景杂交。尽管这些性质使得这些杂交试剂令人满意，但它们比较昂贵，而且有专利方面的限制。

14.3 杂交温度

许多应用中，至少有几百个碱基长度的核酸探针在 42℃的常用杂交液中进行杂交，这种杂交液一般含有 50%的甲酰胺。如果需要更确切的杂交条件或进行经验测定时，可能首先需要得到双链的 T_m 值，然后在一适宜的温度下进行杂交。以下公式中，有显著作用的参数以前已讨论过。

14.3.1 长探针的 T_m 值计算

热力学稳定性可以用以下公式来表示。

双链 DNA（DNA：DNA）分子（Bolton 和 MaCarthy，1962）：

$$T_m = 81.5℃ + 16.6\log[Na^+] + 41\times(G+C)\text{含量} - 0.63\times\text{甲酰胺含量} - 500/L$$

DNA：RNA 杂交分子（Casey 和 Davidson，1977）：

$$T_m = 79.8℃ + 18.5\log[Na^+] + 58.4\times(G+C)\text{含量} + 11.8\times[(G+C)\text{含量}]^2 - 0.5\times\text{甲酰胺含量} - 820/L$$

双链 RNA（RNA：RNA）分子（Bodkin 和 Knudson，1985）：

$$T_m = 79.8℃ + 18.5\log[Na^+] + 58.4\times(G+C)\text{含量} + 11.8\times[(G+C)\text{含量}]^2 - 0.35\times\text{甲酰胺含量} - 820/L$$

式中 T_m——双链分子的解链温度；

(G+C) 含量——鸟嘌呤＋胞嘧啶含量的百分比，mol；

$[Na^+]$——钠离子的浓度，mol/L；

L——参与实际杂交的碱基的数目。

14.3.2 寡核苷酸探针的 T_m 值计算

对于短探针，比如寡核苷酸（第 13 章），寡聚体的 T_m 值可以很快地估算出来，每个腺嘌呤和胸腺嘧啶乘以 2℃，而鸟嘌呤和胞嘧啶则乘以 4℃（Itakura 等，1984）。

$$T_m = 4℃(G+C) + 2℃(A+T)$$

必须认识到，这种关系只有短寡核苷酸（11～27 碱基长）探针，并在含有任何有机溶剂的 1mol/L Na^+（6×SSC）杂交缓冲液中才能成立。正像定义所说的，在 T_m 温度时，只有 50%的双链稳定；因此，低于 T_m 值 5℃的温度，有利于短寡核苷酸的非常严格的杂交。在 T_m－5℃时，所有完全配对的双链都将形成。必须认识到，寡核苷酸探针设计中，探针序列中可能会有一些错配。如果寡核苷酸探针不是完全配对，那就不得不降低杂交的严谨度以容忍错配的发生。如果发生多于一个以上的错配，那就必须降低杂交的温度。

对于长寡核苷酸（14～70 碱基），T_m 值可以通过以下公式计算（Sambrook 和 Russell，2001）。

$$T_m = 81.5 - 16.6(\log[Na^+]) + 41 \times (G+C)含量 - 600/N$$

式中　N——能够与靶序列完全配对的寡核苷酸的长度。

这些应用于寡核苷酸设计的基本原理，同样适用于 PCR 引物设计（后者将在第 19 章论述）。

14.4　杂交和 Northern 分析

核酸探针与靶序列的杂交有三个主要部分：预杂交（也称为封闭），杂交和杂交后洗涤（也称为严格洗涤）。杂交结果的检测，即第 15 章的主题，则是完全不同的事情。

对于普遍使用的探针而言，其杂交条件已经成熟，而且已经商业化。商家推荐了多种通用杂交缓冲液和杂交条件，而且声称“每次都可以产生完美的印迹”。虽然这是事实，人们可有一定准确性地预测某些核酸家族的动力学行为，但在细调杂交条件方面，直接影响杂交物形成参数的知识，其价值是无法估量的。因为这点在使用与靶不完全互补的探针或在系统发生研究中，使用核酸探针来检测斑点和文库时尤为重要。值得注意的是，当需要调整杂交的特异性时，人们经常调整温度和盐浓度这两个变量。

14.4.1　预杂交：滤膜处理

正如第 12 章中讨论过的，核酸样品必须在转膜之后立刻固定在滤膜上。这样滤膜可以保存相当长的时间。杂交前，滤膜要经过预杂交：①在一个类似或相同的实际杂交液中平衡滤膜；②完全封闭滤纸。封闭（Meinkoth 和 Wahl，1984）指的是用切短了的变性的（异源）DNA 覆盖滤膜上没有被实验 RNA 样品占据的任何部位。这些 DNA 来自与 RNA 样品的生物起源不相关的种属，通常选择鲑精 DNA 或小牛胸腺 DNA[1]。封闭滤膜的新方法中，尤其封闭尼龙膜时，使用更多的是酪蛋白或其他蛋白质，而不是异源 DNA。通常，用蛋白质封闭所需的时间比用异源 DNA 封闭所耗费的时间短。它适合于同位素和非同位素监测系统，产生明显低背景的信噪比。因此预杂交很重要，因为在实际杂交过程中，探针分子不可能以非特异性的方式固定在滤膜的表面，这样会产生相当高的背景信号。

现在已经有很多预杂交液配方，它们的确切组成是一种功能的滤膜和用在特定实验中的探针。这里推荐的是在笔者的实验室和其他实验室里应用得比较成功的配方。

---

[1] 异源 DNA 作为载体和滤膜封闭液，以 10mg/ml 的浓度存储于水中。煮沸 DNA，然后持续穿过 18 号针使之剪切化。异源 DNA 的储备液保存在 20℃。使用前，取适量体积后，必须热水煮沸变性 10min。

14.4.2 实验方案：预杂交（长探针）

① 将滤膜在 5×SSC 或 5×SSPE 中浸湿 2～3min。

注意 SSPE 缓冲液比 SSC 好一些，尤其在甲酰胺存在的情况下（Meinkoth 和 Wahl，1984），因为 SSPE 中的磷酸盐实际上模拟了核酸的磷酸二酯骨架，有利于封闭滤膜，从而能在检测阶段改进背景信号。这种策略尤其适合固相化在尼龙（+）滤膜上的 RNA 样品，因为核酸探针的磷酸二酯骨架带负电荷，正好可以和尼龙膜的正电荷中和。20×SSPE：3mol/L NaCl，200mmol/L NaH_2PO_4，20mmol/L EDTA，调整 pH 至 7.4。20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，调整 pH 至 7.0。

② 滤膜 42℃在过量的（250～1000μl/cm²）预杂交缓冲液中预杂交 3～4h，该缓冲液中含有 5×SSPE、5×Denhardt 溶液、0.1% SDS、100μg/ml 新变性的鲑精 DNA 和 50%的去离子甲酰胺。以下是按顺序配制预杂交液组分的流程。

a. 甲酰胺预热至 45℃。

b. 在单独的试剂瓶中混匀 SSPE、Denhardt 溶液和 SDS，然后放置在 45℃。SDS 粉末随着其他组分的加入逐渐溶解成液体状。

c. 在干净的聚丙烯或玻璃试剂瓶中，将所需的鲑精 DNA 溶于无菌水，无菌水的体积为满足预杂交液终体积所需加入的水体积。煮沸该混合物 5～7min。

d. 小心地将煮沸的鲑精 DNA 加入 SSPE、Denhardt 溶液和 SDS 的混合物中，然后将整个混合物直接加到预热的甲酰胺中。小心旋转混匀。42℃存储该缓冲液直至使用。

以这种方式配制预杂交缓冲液的原因是为了避免变性鲑精 DNA 的复性。因为更常用的小体积高浓度 DNA 储存液插在冰里的方式，可能会导致 DNA 的复性。尤其在其他组分都事先预热过的情况下，快速加入甲酰胺能有效地减缓复性的速度。混匀后，该混合物可以立刻投入使用。一般而言，100ml 的缓冲液可用于 2 次印迹的预杂交，还可留 25ml 用于杂交实验。

注意 1 常规的预杂交和杂交最好在平底的塑料容器中进行，而且表面积仅稍大于滤膜面积为宜。几种 Rubbermaid 的食物存储盒和 Nalgene 的多用途盒就不错。确保容器配备一个完全合适的盖子以防止蒸发。这种方法排除了气泡进入隔热塑料袋的可能性，而且避免了高比活性杂交缓冲液在杂交结束后溢出。

注意 2 把杂交瓶放置在一个轻柔移动（30～50r/min）的平台上，比如轨道振荡孵育器（Lab-Line），这样可以使得缓冲液平稳地浸润滤膜的整个表面，从而得到比较好的数据。

注意 3 过量缓冲液下的预杂交有利于降低探针（加入之后）和滤膜之间的相互作用。封闭后，加入探针前，可以相应减少杂交缓冲液的体积，以维持较高的探针浓度。

③ 预杂交结束后，倒出预杂交缓冲液，加入新的杂交缓冲液（理想的体积 100μl/cm²）。许多情况下，预杂交缓冲液和杂交缓冲液是相同的（见准备工作的第②步）。

14.4.3 探针变性

双链探针使用前需要先变性。一般可通过煮沸探针或提高 pH 的方法达到探针变性的目的。因为在非同位素体系中，标记方法涉及许多变量，所以最好遵照厂商说明书进行探针的变性。如直接酶标记的情况下，探针已经是单链了，所以无需再进行处理。

当心 同位素标记的探针不应该煮沸变性，因为会产生放射性的蒸汽。所以替代方法是，在探针（通常是 50～100μl）中加入 0.1 体积的 1mol/L NaOH，37℃孵育 10min 或室温放置 30min。这样，只要探针的总体积不超过 150μl（假设杂交缓冲液的最小体积为 5ml），探针就可以直接加入杂交缓冲液，而不需要进行中和。

14.4.4　杂交

④ 杂交缓冲液中加入探针，然后 42℃杂交 12～16h（过夜）。确保盖紧杂交瓶的盖子。

注意 1　检测稀有 mRNA 或单拷贝基因时，每毫升杂交缓冲液中要有 5～20ng 探针或（1～5）×10^6 cpm/ml 的探针。

注意 2　如果探针的质量很低，提高鲑精 DNA 的浓度，这样可以改善杂交动力学。

注意 3　可以加入和分子量标准配对的 25ng 探针，这样在同一张胶片上就会同时存在分子量标准和实验样品的直观记录。

14.4.5　杂交后严格洗涤

根据探针的特性和杂交产物的稳定性，研究者可能会针对每一种探针调整杂交后洗涤的条件。值得注意的是，杂交后洗涤的过程中，严格度是离子强度、温度和时间的综合体现。因此通过升高温度或降低盐浓度来缩短洗涤时间的方式不太妥当。

⑤ 杂交结束后，倒掉杂交缓冲液，洗膜以除去所有未参与杂交产物形成的多余探针分子。

a. 室温下用 2×SSPE、0.1% SDS 洗膜 30s，去除杂交瓶和滤膜上的大部分探针。

b. 室温下用 200～300ml 的 2×SSPE、0.1% SDS 洗膜 15min，两次。

c. 37℃用 200～300ml 的 0.1×SSPE、0.1% SDS 洗膜 15min，两次。

注意　如果背景太高，最后一次洗涤改用 42～50℃的 0.1×SSPE、0.1%SDS 洗膜，可能会有效。对于每种新的探针，洗涤条件需要按照经验事先进行优化。

⑥ 用 2×SSPE 简单洗膜，然后把滤膜放置在一片 Whatman 纸上，放置足够长的时间以确保滤膜表面过多的缓冲液呈点状分布。

重要提示　千万不要让滤膜干透，选择化学发光法作为检测手段时尤其如此。

⑦a 如果选择化学发光法或发色检测技术检测时，可以直接把滤膜放进检测缓冲液中，然后按照该体系的厂商说明书进行操作。

⑦b 如果使用同位素，则滤膜用保鲜膜包裹后，进行放射自显影（第 15 章将论述）。

注意　如果放射自显影之后还要去除第一种探针，再与另一种探针杂交，请确保滤膜的湿润。

14.5　参考文献

Blake, R. D., and Delcourt, S. G. (1996). Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res.* **24,** 2095.

Bodkin, D. K., and Knudson, D. L. (1985). Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA-RNA blot hybridization. *J. Virol. Methods* **10,** 45.

Bolton, E. T., and McCarthy, B. J. (1962). A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48,** 1390.

Bonner, T. I., Brenner, D. J., Nenfeld, B. R., and Britten, R. J. (1973). Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *J. Mol. Biol.* **81,** 123.

Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1985). Hybridization strategy. *In* "Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach" (B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds.), pp. 3–16. IRL Press, Washington, DC.

Casey, J., and Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Res.* **4,** 1539.

Chang, C.,T., Hain, T. C., Hutton, J. R., and Wetmur, J. G. (1974). Effect of microscopic and macroscopic viscosity on the rate of renaturation of DNA. *Biopolymers* **13, 1847.**

Denhardt, D. T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23,** 641.

Itakura, K., Rossi, J. J., and Wallace, R. (1984). Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* **53,** 323.

Lederman, L. L. (1981). The rate of nucleic acid annealing to cytological preparations is increased in the presence of dextran sulfate. *Anal. Biochem.* **117,** 158.

Marmur, J., and Doty, P. (1961). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **3,** 584.

Meinkoth, J., and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138,** 267.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (Eds). (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98,** 503.

Subirana, J. A., and Doty, P. (1966). Kinetics of renaturation of denatured DNA. I. Spectrophotometric results. *Biopolymers* **4,** 171.

Thrower, K. J., and Peacocke, A. R. (1968). Kinetic and spectrophotometric studies on the renaturation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **109,** 543.

Wahl, G. M., Stern, M., and Stark, G. M. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76,** 3683.

（黄冰译；姚成果校）

第15章 检测原理

15.1 基本原理

实验最终结果的可靠性取决于实验每一步的可靠性。其中，在整个实验过程中确保每一步核酸样品的完整性就极其重要。此外，设计与探针标记方式相适用的系统来检测杂交过程也极其重要。标记及检测方法的选择主要取决于所需要达到的灵敏度及分辨率。由于非同位素检测方法的极大改进，特别是化学发光技术的改进，目前出现的一个比较现实的问题是，是否还需要使用放射性方法。

非同位素标记方法和化学发光检测方法自出现后就成为理想的放射标记的核酸探针的替代方法而应用于印迹分析及原位杂交。如同第13章所述，目前已有许多种非同位素标记探针的方法，而且这些方法已经很常见。由于这些新标记方法的出现，许多实验室已减少了或停止了同位素的使用。现在已证实化学发光检测方法是一种能克服显色检测法相关的许多常见缺点的优越的检测方法。鉴于化学发光检测法的实用性，随着人们习惯的逐渐改变，这种方法得到越来越广泛的应用。

不仅是核酸探针的标记及检测方法（包括用抗体识别半抗原在内）多种多样，分子生物学家所采用的技术也多种多样。但每个实验（包括杂交在内）的最终目标有两个。

① 确定探针在滤纸上的位置，或在分析过程中确保探针与目标分子稳定配对。

② 杂交于条带上的探针或杂交于组织特异区域的目标分子上的探针的定量。

总的来说，有两种标准的检测策略：放射性同位素技术和非同位素技术。同位素方法包括放射性标记及放射自显影检测（见后述）和/或Cerenkov计数。非同位素方法已日渐成熟，可用于滤膜检测、微量滴定板检测、直接从凝胶中检测、直接用视频捕捉以及用其他方法检测。有四种标准的非同位素检测方法。

① 化学发光法：酶促反应产生的可见光，常用X射线胶片记录。

② 荧光法：某些化合物受一定波长的光激发后会发荧光，常用荧光成像系统记录。

③ 化学荧光法：酶促反应将荧光底物转变成能产生荧光的产物，常用荧光成像系统记录。

④ 显色检测法：酶促反应形成有颜色的沉淀直接沉积在滤膜或组织上，有色沉淀物显示了目标分子的分布。

早期非同位素标记及检测方法中，通常用生物素标记核酸。杂交结果通过链霉亲和素-碱性磷酸酶检测系统来检测，这种系统将无色底物通过酶促反应转变为不溶的有色沉淀。这种方法通常叫作显色反应检测法或比色检测法。此方法并没有得到广泛应用，因为它的一个

严重的缺点是，与放射自显影相比灵敏度较差。但是，现在许多原先为显色反应检测法而设计的方法，已经被改进为适用于化学发光法来检测。在许多情况下，适用于化学发光检测法的探针合成标记方法，与显色检测法中的探针标记方法是相同的。这些技术的差异在于杂交后滤膜的处理方式——除检测试剂外，洗膜严谨度也可能不同。不论化学发光检测法中使用哪种技术，发射出的可见光都用 X 射线胶片记录。

15.2 放射自显影[1]

放射自显影是一种简单而灵敏的光化学技术，用于记录样本内放射性标记化合物的空间分布。在核酸研究中，放射性标记的探针可以固相化到固体支持物上，并与溶液中或原位的目标分子进行杂交。将感光乳剂与放射源直接接触，可以捕获电离辐射和光子，从而较长期地记录不稳定放射性核的衰变过程。根据放射性样品的种类、用于成像的感光乳剂的类型和结果的检验方法，放射自显影大致可以分为两类，即通常所指的整体放射自显影和显微放射自显影。

在分子生物学领域，放射自显影最常用于杂交后的核酸定量分析。当放射自显影和电泳技术联合使用，所得到的图像还可以做定性分析。例如，用 Northern 印迹分析基因表达情况（整体放射自显影）时，根据杂交膜上的放射性同位素的位置及辐射强度，可以估算出与特异探针配对的目标 RNA 分子的大小及数量。而在显微放射自显影中，样品通常是被感光乳剂包被的较大样本的一个薄的切片。这项技术也就是所谓的原位放射自显影，通常是直接在显微镜用的载玻片上操作。由于天然细胞的几何形状得以保持，放射性标记物在细胞内的分布可以用光学显微镜或电子显微镜轻易观察到（如计算颗粒数）。

在整体放射自显影过程中，一张高感光度的医用 X 射线胶片，直接与塑料薄膜包裹的杂交膜直接接触，这就是通常所说的直接曝光。在某些实验中，如核酸酶保护实验，聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶中的放射性同位素可以直接检测。感光胶片的基质是一层柔韧的聚酯[Kodak 公司用于放射自显影的胶片厚约 0.007in(1in=0.0254m)]，基质的一侧或两侧包被感光乳剂。对射线及光线敏感的乳剂，包含卤化银（溴化银、氯化银或卤化银混合物）晶体，光子及电离辐射的能量就释放到卤化银晶体上。在胶片曝光过程中，能量被感光乳剂中的卤化银颗粒吸收后释放出电子，最终导致形成带负电荷的“斑点”，也即晶格中的瑕疵；这些“斑点”吸附带正电荷的银离子从而形成金属银原子。X 射线胶片曝光后，形成所谓的不可见的潜影，用合适的显影液浸泡后，就可以形成可见的图像。潜影只是含有可显影的银颗粒，在有安全光线的暗室里是看不见的，而且这时感光乳剂还完全是光敏感的。可以通过胶片预闪（见后述）和低温曝光来增强潜影的形成。潜影一旦形成后，在长时间的曝光过程中并不稳定，这种不稳定会因为氧的存在及胶片的湿度而加剧。最终显影出的图像可以直接通过视觉观察来分析，如果需要更高的精确度，则可以通过数字成像分析。整个的显影步骤见图 15.1。

放射自显影的胶片，可以用手工或机器来冲洗。不管用哪种方式，胶片的处理过程都相同，即显影、洗片、定影、洗片及晾干[2]。在显影液中，胶片感光乳剂中曝光的卤化银颗粒还原成金属银原子，从而增强了潜影的形成。完成显影所需的时间取决于胶片曝光的程度、

[1] 部分改编自 Eastman Kodak 公司

[2] 对于手工冲洗 X 射线胶片而言，Kodak D-76、D-19 和 GBX 显影液以及标准的 Kodak 定影液效果都很好。

显影液的温度、显影液的新旧程度及实验员对背景深浅的接受程度。应当尽可能使显影过程的参数标准化，以使从不同胶片所冲洗出的图像具有可比性。

将胶片浸入化学“终止液”中，可以终止显影过程。目前可以买到多种终止液，终止液也很容易配制，即 1%的乙酸溶液。在恰当的时间终止显色反应非常重要，因为过度的显影，会使任何曝光在胶片上的图像变得模糊不清。值得注意的是，当胶片从显影盘中取出时，仍沾有显影液，直到中和前显色过程仍在进行。如果没有合适的终止液，可以将显影后的胶片立刻放入水中以稀释并洗去残余的显影液。上述操作不仅可以终止显影过程，还有利于延长定影液的使用寿命。下一步便是将胶片浸入定影液中，以溶解未曝光的卤化银。最后，在室温下将胶片浸入水中彻底清洗，以除去胶片冲洗过程中产生的副产物。当胶片晾干后，一张比较稳定的照片就洗好了。

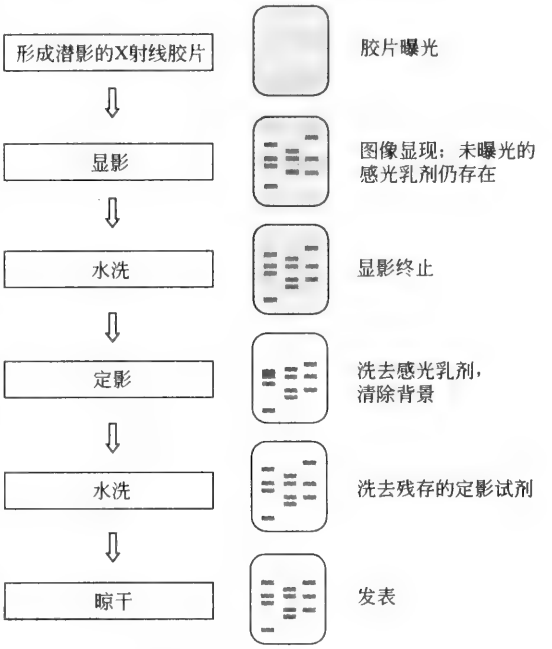


图 15.1　X 射线胶片显影步骤。虽然胶片的选择取决于实际应用（放射自显影或化学发光法），X 射线胶片的冲洗过程都是相同的

如果手工冲洗胶片，每张胶片的显影、清洗和定影时间必须相同。如果没有这样的监控，就很难判断最终的数据差异有多大程度是由实验操作引起，多大程度是由胶片冲洗造成的。手工冲洗胶片的优点是：实验者可以延长显影时间以增强较弱的条带信号；实验者也可以减少显影时间来降低背景或减少某些信号特别强的条带的过度显影。机器冲洗胶片的优点是胶片都是按照统一的标准来冲洗，但这样实验者会比较被动。

放射自显影曝光的机制［参见 Bonner 的综述（1987）］和感光乳剂的选择，取决于同位素放射光谱的能量、所需要的图像质量和体系中掺入的放射剂量。曝光时间及曝光方法的确定并没有严格的规则可循，这些参数必须在每次实验中根据经验来确定。

15.2.1　滤膜的处理

用于 Northern 印迹、斑点印迹和类似技术的滤膜，在最后一次严谨洗涤后不能完全干燥。滤膜应放在 Whatman 3mm 滤纸或相应装置上，然后包在塑料纸中做印迹。滤膜保持湿润状态有利于放射自显影后通过高严谨度洗涤除去杂交的探针。这样，一张滤膜就可以用其他目的探针杂交多次。从完全干燥的滤膜上除去探针，要比从湿润的滤膜上清除探针难得多，有时几乎不可能被除去。千万不要将湿润的滤膜直接与 X 射线胶片接触，这样会使滤膜和胶片粘在一起，从而导致滤膜和胶片的毁坏。

15.2.2　X 射线胶片

X 射线胶片的选择取决于标记所使用的是高能放射源还是低能放射源以及所要达到的分辨率高低。最常用于放射自显影及化学发光法的 X 射线胶片是 Kodak X-OMAT AR(XAR)、

X-OMAT LS(XLS) 和 BioMax 的系列胶片。未开封的 X 射线胶片应当存储于50～70℉[1]，并要有防射线穿透的防护。开封后建议保存在 30%～50%的相对湿度条件下。过期的胶片应垂直竖立存放，而不要水平堆叠存放。

XAR 胶片具有极大的灵敏度，适用于大多数的放射自显影操作。该胶片在透明基质的两侧都有感光乳剂包被。放射自显影最终是在灰色胶片上显出黑色图像。XAR 胶片有两种规格：①XAR-5 胶片，有一种分隔式的包装可选，这种包装可以在运输过程中保护每一张胶片，而且能避免在胶片抽出盒子过程中产生静电而使胶片曝光；②XAR-2 胶片，这种胶片每一张都包装在一个密封的封袋中。

XLS 胶片比 XAR 胶片有更好的清晰度，背景更清晰。该胶片也是双层感光乳剂，基质呈蓝色。这种胶片是一种比较经济的选择，当不需要达到 BioMax 或 XAR 的最好效果时。该胶片是在蓝色背景下显出黑色图像。虽然这种胶片所显现的杂交信号较为清晰，但其平均曝光时间是 XAR 胶片的 2 倍。因此，可以先用 XAR 胶片做首次曝光，然后再用 XLS 蓝色胶片做最终的曝光。

BioMax 胶片是最新一代的可用于放射自显影和化学发光法的 X 射线胶片。BioMax MS 是一款适用于放射自显影的高性能的通用胶片。BioMax MR 则是适用于低能 β 放射源如^{35}S、^{33}P和^{14}C的具有最高分辨率的胶片。而 BioMax Light 是为化学发光等方法设计的具有最高灵敏度的胶片。本实验室一直使用 BioMax 胶片，这种胶片的一个明显优点，是它的片基背景是透明的而不像 XAR 的灰色。透明的背景使得胶片上极其微弱的条带都清晰可见，因而更适用于目前的扫描及数字成像分析方法。

图 15.2 列出了适用于放射自显影及化学发光法中不同灵敏度及分辨率需要的胶片类型。

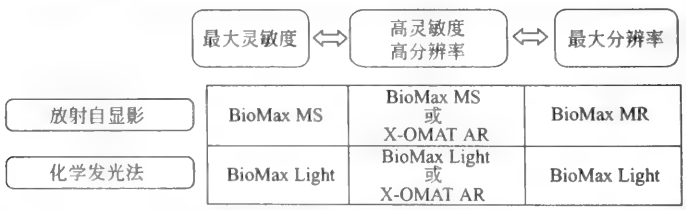


图 15.2 适用于不同灵敏度及分辨率要求的 X 射线胶片。详细介绍见正文。
本图刊登经由 Kodak 公司允许

15.2.3 安全灯

虽然未显影的 X 射线胶片在定影之前一直对光敏感，但在暗室里可以容许有低强度光照以便于胶片的移动和快速处理。安全灯一般是用 15W 的普通灯泡外包滤膜，滤膜的颜色要使透过的光线不会使胶片曝光。由于化学发光法及放射自显影通常所使用的胶片一般对蓝-绿光敏感，暗室中一般使用红色的 GBX 2 安全灯滤膜[2]。所谓安全灯其实也不是非常安全，因为长时间在安全灯下照射会使冲洗出的胶片变模糊。理想情况下，胶片与安全灯的距

[1] 摄氏温度（℃）与华氏温度（℉）的换算公式为：

$$(t)_{℃} = \frac{5}{9} \times ((t)_{℉} - 32)$$

[2] 一款价廉物美的适于快速建立简易暗室的安全灯是 GBX 2，Kodak No. 141 6627。其特点是小巧，便于携带，经久耐用。

离不要小于 4ft(1ft=0.3048m)。需要注意的是安全灯滤膜会随着使用过程变长而褪色，因此应当定期检测。检测方法很简单，即在安全灯打开和关闭的情况下各冲洗一张未曝光的胶片，安全灯打开时冲洗出的胶片如果变模糊则表明需要更换安全灯滤膜了。

此外，保护胶片免受安全灯之外的其他杂散光的照射也很重要。虽然从经济角度而言，任何一个房间都可以用作暗室来冲洗胶片，但重要的是必须确保不会有从门下、窗户边沿、墙上及屋顶的孔洞或屋内放置的仪器的指示灯（如电脑的显示器）而来的光线。

15.2.4　曝光时间

一个放射源的曝光次数只取决于它的半衰期长短。对于高能量的放射源，可以用 Geiger 计数探测器靠近膜来探测放射性的强度。很显然，一个高达 3000cpm 的放射源，与一个比背景环境只高出几个读数的放射源相比，只需要极短的曝光时间。遇到缺乏明显信号的情况时不要立刻灰心丧气，对放射自显影来说，检测一个单拷贝基因或稀少 mRNA 的杂交信号，通常都需要 3 天或更长的曝光时间才能观测到信号。

一般可以先用 XAR 胶片于室温下曝光过夜，来估计背景及膜上非特异的杂交信号。随后的曝光方案可以参照上述曝光的结果。对于放射强度低的膜，可以通过使用增感屏来缩短曝光时间；如果直接对凝胶上的放射源曝光，可以使用荧光摄影术。与直接曝光的放射自显影不同的是，这两种信号增强技术都是温度依赖的。而单独低温并不能促进直接曝光时图像的形成过程。

15.2.5　增感屏

在放射自显影过程中，使用增感屏可以增强对电离辐射的检测。增感屏是一种用无机荧光物质包被柔韧的聚酯材料而制作的屏。在整体放射自显影过程中，常用的增感屏是由钨酸钙包被的增感屏，如 DuPont Cronex Lightning Plus Intensifying Screen[1]，这种屏非常适用于超过 1 天的曝光过程。有机荧光物质能将电离辐射转变为紫外线或蓝光，这种增感屏能发出蓝光，噪声（背景信号）很低，因此非常适用于标准的放射自显影。在用于曝光之前，有必要将增感屏在暗处放置几小时或过夜，因为没有暗适应的增感屏的“余辉”效应会使冲洗出的胶片变模糊。与双面都包被感光乳剂的 X 射线胶片不同，增感屏只有一面包被了荧光物质，因此必须按正确方向放置。钨酸钙包被的一面呈白色，没有包被的另一面呈灰白色。在笔者的实验室中，为避免在暗室中弄错了增感屏的方向，在增感屏没有包被荧光物质的一侧的边缘粘上厚条带，这样在暗室中就可以通过触摸确保将增感屏包被有荧光物质的一面对着杂交膜。低温（−80℃）下进行放射自显影，有利于发挥出增感屏的最大能量转换效率，因为低温时胶片对弱光的反应性大大增强。要注意的是胶片感光范围要与增感屏的发射光谱相匹配。使用增感屏曝光的强度要明显强于不用增感屏的曝光强度。增感屏可以用于增强对高能 β 放射源[2]（如^{45}Ca 和^{32}P）以及 γ 射线放射源（如^{125}I）（Laskey 和 Mills，1977；Swanstrom 和 Shank，1978）的检测，对^{3}H、^{35}S 和^{14}C 则无效。

不管增感屏在曝光过程中将被用作何种用途，它在曝光暗盒中的正确放置位置是非常关

[1] 此外，还可以选用稀土元素氧化物制作的增感屏，如 DuPont Cronex Quanta Ⅲ也很常用。

[2] 在放射自显影中，^{33}P 主要用于 DNA 测序，它与^{35}S 和^{32}P 一样，不需要使用增感屏。详见参考文献 Zangursky 等(1991)。

键的。胶片应放置于样本和增感屏之间，这样胶片不仅能被同位素的电离辐射直接曝光，还能“感受”到增感屏发出的光。如果需要使用第二块增感屏，应放置在样本后面。不要将胶片放在两块增感屏之间，而将样本放在外边，这样会降低图像的锐度（锐度高则敏感度高）。其实即使只使用一块增感屏，图像的锐度也会有所下降，这是由于β粒子从放射源出来后穿过胶片到增感屏时发生散射而导致的。其实，暗盒内的β粒子在撞击增感屏时是相当活跃的。仅仅对β能量源直接曝光时，这种额外扩散的能量会造成胶片上更广泛区域的曝光。总而言之，增感屏可以增加敏感度从而缩短曝光时间，但它也会降低分辨率。

15.2.6 荧光成像法

荧光成像法是一种图像强化的方法，其原理是利用同位素衰变粒子与一种称为萤石的复合物相互作用，从而将同位素衰变过程释放的能量转变为光，然后使 X 射线胶片曝光。与增感屏相比，荧光成像术是一种图像强化过程，主要在使用低能的放射源为标记物时应用，如^{3}H（Randerath，1970；Bonner 和 Laskey，1974）。荧光成像需要先将样本（如聚丙烯酰胺凝胶）浸渍在荧光成像溶液（闪烁液）中，然后将凝胶取出干燥后再进行放射自显影检测。市场上可以买到的闪烁液，有 2,5-二苯基噁唑的混合液（即 PPO）或水杨酸钠。虽然闪烁剂浸渍不能改进对^{32}P 或^{125}I 的检测效果，但可以增强对^{14}C 和^{35}S 的检测，而且几乎总是用于^{3}H 的检测。因此，荧光成像法与增感屏的信号放大作用不同，后者可被视为一种外部的萤石。被闪烁液浸渍过的样本应在－80℃用预闪过的胶片（Kodak X-OMAT AR）曝光以确保胶片的曝光反应是线性的。荧光成像法一般不常用于常规的分子生物学实验中。

15.2.7 胶片预闪

为了增加胶片对弱光的敏感性及胶片的线性曝光反应，在曝光前可以选择对胶片进行预闪或增敏处理。当胶片对短暂的猝发光曝光时，胶片被激发，即启动了潜影的形成过程。然后来自闪烁液或增感屏的光子促使潜影形成。胶片预闪特别适用于荧光成像法或使用增感屏来促进图像的形成。预闪对于单靠电离辐射形成潜影的过程并没有什么作用。此外，预闪还可以用在化学发光法中，增加 X 射线胶片的敏感性。

15.2.8 暗盒的规格

在放射自显影曝光过程中，选择一个合适的不透光的暗盒，是决定成败的最基本的要求。Sigma 公司的由乙烯树脂覆盖的曝光暗盒（Sigma No. E8635）虽然不是非常精细，但价格便宜而且用途广泛。使用时建议将暗盒放置于两块 1cm 厚的树脂玻璃之间，以阻断高能β粒子可能对实验员和附近人员造成的身体伤害。此外较为常用的是一种重量上比较轻、由乙烯树脂包被的铝制作而且内部固定有增感屏的较好的暗盒。盒内的聚氨酯垫片有助于维持胶片与膜持续而均衡的接触。此外还有由不锈钢制作的暗盒。另外还有一类真空曝光暗盒，适用于曝光过程不能有氧及湿气存在的情况。实验室在选用暗盒时必须要确定曝光装置要适合各种需要，不管是放射自显影还是化学发光。在准备曝光装置时，极为重要的一点是，滤膜在暗盒内必须固定不动，在曝光过程中，滤膜的任何哪怕是极微小的移位都将使最终的图像失真。一个比较简单的方法是将塑料纸包裹的滤膜固定在一张裁剪成暗盒大小的 Whatman 滤纸上。不要在增感屏上直接粘贴东西。

15.2.9　显影与定影

曝光后的胶片依次经过显影液、显影终止液、定影液及最终的仔细清洗等处理过程后，上面的不可见的潜影才会转变成可见的放射自显影图像。对于任何一种 X 射线胶片，制造厂家都会推荐与之相适用的显影液及定影液。胶片可以在暗室里用手工冲洗而不需要用任何仪器。此外如果有胶片冲洗机器，可以用机器自动冲洗胶片。如果曝光是在－80℃进行的，则需要等到胶片温度升到室温后再打开暗盒冲洗胶片，否则，图像的质量及实验的可重复性可能会比较差。如果手工冲洗胶片，胶片应当用流水（16～24℃）清洗 15min 以上然后晾干，这样得到质量最好的图像。

15.2.10　放射自显影：推荐方案

当心　对于所有涉及同位素的实验，必须严格遵照要求正确存放放射性物质；遵守所有安全规范，以减小对实验员健康的危害。带有放射性滤膜的操作，最好应在树脂玻璃的防护下进行。

为了获得有意义的数据，有必要使曝光时间及显影时间标准化。对同一个印迹样本，用较短时间曝光或用较长时间曝光以及采用不同的冲洗方法，都会导致所得的结果完全不同。

（1）部分Ⅰ：开始曝光

① 做完杂交后的所有严谨洗涤过程（第 14 章）后，将杂交膜放于一张略大于 Whatman 3mm 滤纸上，吸去残留在膜上的缓冲液。

② 用塑料纸包裹已经探针杂交的膜，小心避免在膜的边缘产生皱褶。包裹膜的塑料纸多折叠几次，以确保不会在曝光时将 X 射线胶片弄湿。

注意　潮湿的杂交膜直接与 X 射线胶片接触会导致两者的紧密粘连。两者一旦粘在一起就分不开，最终导致杂交膜与胶片全部作废，实验失败。

③ 在塑料纸包裹好的杂交膜上方 10～15cm 处，手持一盖格（Geiger）计数探测器，检测放射性的强弱以估计放射自显影所需的时间。用 Northern 技术检测稀有的 mRNA 以及用 Southern 技术检测单拷贝基因时，杂交膜上探测到的“嘎嘎”计数声，通常比从背景探测到的计数声多不了多少。如果探针中掺有与分子量标记互补的探针时，那么最后在膜的分子量标记区往往能探测到更强的信号。在膜表面探测到大片的高强度信号意味着背景比较高。

④ 在安全灯（例如 GBX-2 型安全灯，Kodak No. 141 6627）下，将塑料纸包裹的杂交膜、一张 XAR-5 胶片和一张增感屏一起放入暗盒。于－80℃存放过夜。

（2）部分Ⅱ：胶片显影

⑤ 曝光结束后，从－80℃冰箱拿出暗盒使其温度上升到室温。如果使用自动 X 射线胶片冲洗机，在安全灯下打开暗盒拿出胶片，按照机器的使用说明操作，然后从第⑮步开始操作。如果是手工冲洗胶片，按照第⑥～⑭步的说明来操作。

⑥ 显影液[1]应事先配制好并存储于密封的避光瓶中，因为显影液对光敏感，见光会很快氧化。Kodak 公司推荐使用 Kodak GBX 显影液[2]。在笔者的实验室也经常使用 Kodak D-76

[1] 注意：避免皮肤接触到显影液、终止液和定影液，操作以上这些溶液及其他所有化学物质时，注意佩戴眼睛保护装置。

[2] GBX 显影液和固定液有成对的包装可供购买（例如 Sigma No. Z35，414-7）。

显影液（Kodak No. 146 4809）。在托盘中倒入足量的显影液浸没胶片。刚从存储瓶中倒出的显影液应当是无色透明的。随着使用次数的增多，显影液被氧化而呈黄色。略微变黄的显影液虽然不是很理想，但是只要显影液还是透明的就仍然能用，但即使此时冲洗出的胶片质量还凑合，使用这种显影液仍应当作为最后的候选方案。变成暗黄色或棕色的显影液已完全失效，必须立即倒掉。

⑦ 准备第二个托盘，里面倒入某种终止液或水。

⑧ 准备第三个托盘，里面倒入定影液（Kodak No. 197 1753）。与显影液一样，定影液也需要事先配制并保存于密封的避光瓶中。盘中倒入的定影液也要能没过胶片。

⑨ 记住暗室中各种物品的摆放位置，然后关灯。否则在黑暗中到处摸索是不利于操作的。

⑩ 打开安全灯，关闭照明灯。戴好手套，打开暗盒，移动胶片前，在胶片的一角折一下以便于以后能判别胶片的方向。不要扔掉或者改变杂交膜的相对位置，并确保塑料纸包裹的杂交膜没有粘在胶片上（这种情况时有发生）。

⑪ 将胶片浸入显影液中，不要将胶片只是漂浮在显影液表面。开始显影计时，并轻轻摇动显影托盘。曝光的胶片通常在 60s 内开始显出条带，但有时要长达 2.5min 才显出条带。当条带开始出现时记录下所需的时间，用作以后冲洗胶片的参考。这样可以确定标准的显影时间，这对于分析不同批次的实验结果而言是非常有意义的。

⑫ 显影结束后，立刻将胶片从显影液中取出并浸入终止液中漂洗 20～30s。

⑬ 将胶片转移到第三个托盘中，浸入定影液中。轻轻摇动托盘，片刻后可以观察到胶片变透明。通常在 5min 之内胶片变得完全透明，此时定影过程结束。有时定影过程需要延长至 5～10min。

⑭ 定影结束后，可以打开照明灯。小心地将胶片转到盛有温水的水槽中，用流水漂洗 15min 以上，将残留的化学物质清除干净。这样清洗有助于获得高质量的胶片。将胶片挂起来晾干。

⑮ 如果首次曝光洗出的胶片很干净则表明背景很好。然后可以接着进行第二次曝光，于－80℃放置 3 天。重复上述步骤冲洗胶片。如果首次曝光后冲洗出的胶片背景很高，没什么明显条带，而且在胶片上显出杂交膜的轮廓，此时可以考虑将杂交膜从塑料纸中取出，重新进行最严谨的洗涤[1]。更为严谨的洗涤方式为：将杂交膜在 0.1×SSPE、0.1% SDS 溶液中于 55～60℃洗 10～15min。然后重新包裹杂交膜曝光。

⑯ 按照生产膜的厂家说明，除去杂交膜上的探针，然后保存。

15.3 非同位素方法

非同位素方法的核酸探针合成和杂交后检测的核心是在探针中掺入标记。这种标记随后会定位到杂交膜上，并具有可重复的分辨率和灵敏度。非同位素的方法有：①化学发光法，即通过酶促反应促使合适的底物发光；②显色检测法，即通过酶促反应直接在膜上形成有色的沉淀物质。在化学发光法中，发出的光可用 X 射线胶片来记录，其所需的曝光时间比放

[1] 如果使用化学发光法，严谨洗涤过后需要再次对杂交膜进行封闭，随后进行其他步骤，如半抗原的识别、酶标物的结合及加入合适底物反应发光。工作量比较大，因此建议第一次严谨洗涤膜时尽量充分些，以避免重洗。

射自显影要短得多。在显色检测法中，通过直接检测杂交膜表面的沉淀物来分析实验结果。化学发光法和显色检测法的优点是不用接触放射性材料及不存在同位素垃圾的处理等问题。而且检测时间从几小时或几天减少到几分钟。

许多生物试剂及产品的生产厂商已经研发出许多基于化学发光的非同位素标记与检测系统。总的来说，非同位素检测方法的原理主要是依次将一系列试剂如生物素（Bio）、地高辛（DIG）、荧光素（FL）或酶直接连接到探针上形成“分子三明治”，例如增强型化学发光（ECL）系统（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ）。而且，在非同位素方法中，杂交膜需要进行严谨洗涤和非严谨洗涤，后者用中高浓度的 SDS 溶液，最后一次洗涤要在干净的容器中进行，以确保没有残留物抑制检测反应所用的酶的活力（见后文详述）。

15.3.1　生物素

生物素是一种水溶性的小分子维生素，很容易连接到许多生物分子上。核酸探针的生物素化有以下几种方式。

① 生物素化的核苷酸。实际上，所有传统的酶促探针合成法，包括随机引物法、缺口平移法和聚合酶链反应（PCR），都可以用生物素化的核苷酸来进行。例如作为 dTTP 的类似物的 Bio-11-dUTP[1]，前缀 Bio 表明该核苷酸是生物素化的，而且生物素分子与核苷酸分子间有 11 个原子的连接臂相连。此外还可以用 Bio-21-dUTP 标记 DNA。与此类似，Bio-16-UTP[2] 和 Bio-21-UTP 可以标记 RNA。一般来说，连接臂越长，检测反应中生物素越容易与链霉亲和素相互作用。但相比而言，连接臂越短，在缺口平移、随机引物法及 PCR 中，生物素化的核苷酸的掺入效率越高。Bio-11-dUTP 是权衡标记掺入效率和检测灵敏度的最佳选择，因此被广泛用于非同位素 DNA 探针的合成。

② 生物素化的引物。最简单的生物素化方法是在寡核苷酸合成过程中进行的，这种生物素化的寡核苷酸可以直接用作探针或用于 PCR。现在倾向于直接订购 5′ 端生物素化标记好的寡核苷酸。这样就不用再担心在检测过程中标记掺入效率的问题。寡核苷酸生物素化标记的额外费用可以很容易地通过标记的高效率和方便性得以平衡。

③ 光激活的乙酸生物素[3]（Forster 等，1985；McInnes 等，1987；Denman 和 Miller，1989）。这种材料是一种芳基叠氮化的生物素衍生物，可用于标记单链或双链的 DNA 或 RNA。标记反应由可见光催化，只需 20～30min 便可以完成。平均每 50～100 个核苷酸中掺入一个生物素分子，因此不能用于标记寡核苷酸。用这种方法标记的探针与用其他生物素化方法标记核酸分子一样稳定。

④ 生物素化的补骨脂素（Cimino 等，1985；Wassarman，1993）。补骨脂素及其衍生物是平面三环化合物，在 320～400nm 光照下可以嵌入双链核酸。这些分子可以共价交联到核苷酸的碱基上，特别是与胸腺嘧啶脱氧核苷交联，因此其标记效率比光激活的生物素高得多。稍差一些的是单链分子如寡核苷酸也能被修饰。生物素化的补骨脂素衍生物（Schleicher & Schuell，Keene，NH）对核酸杂交中所用的生物素化探针的合成非常有用。用正丁醇抽提可以容易地将

---

[1] Biotin-11-2′-deoxyuridine-5′-triphosphate，tetralithium salt（生物素-11-2′-脱氧尿苷酸-5′-三磷酸四锂盐）。

[2] Biotin-16-2′-uridine-5′-triphosphate（生物素-16-2′-尿苷酸-5′-三磷酸盐）。

[3] 光激活的乙酸生物素：*N*-(5-叠氮-2-硝基苯基)-*N*′-(3-生物素化氨丙基)-*N*′-甲基-1,3-二氨基丙烷。Pierce Biotechnology，Rockford，IL 有售。

未掺入的生物素化的补骨脂素除去。

标记后的生物素化探针可以在－20℃稳定保存一年，可分装成小份冻存。用前取出一份探针融化，如果是双链探针则在沸水浴中煮过后立即放于冰上冷却，然后加入到杂交缓冲液中。生物素化探针可以用于显色检测法和化学发光法。

生物素分子与链霉亲和素分子间有极高的亲和力（$K_d = 10^{-15}$ L/mol）。链霉亲和素是一种从链霉菌中分离出的四聚体蛋白（M_w 60000），其上有四个生物素结合位点。与亲和素（从鸡蛋中提取）不同的是，链霉亲和素的等电点呈中性，在生理 pH 条件下带电基团不多，而且没有糖链修饰。这些特性有利于减少非特异吸附，降低背景，从而提高检测灵敏度。近年来已有许多关于生物素-链霉亲和素及相关技术应用于核酸杂交的报道（典型的应用实例见 Leary 等，1983；Wilchek 和 Bayer，1984；Hofman 和 Finn，1985），并且应用的多样性在不断增加。生物素检测系统的第一步是生物素与链霉亲和素的结合。在某些系统中，链霉亲和素是经过修饰的，如连接有 AP 或辣根过氧化物酶（HRP）。AP 可以将相应的底物去磷酸化而发光（如底物为二氧环己烷）或形成有色沉淀（如 BCIP 和 NBT）❶。HRP 在有过氧化氢（H_2O_2）存在时可以引发化学反应导致发光［如由发光氨（luminol）介导］或形成有色沉淀（如由 4-氯-1-萘酚介导）。

15.3.2 地高辛

地高辛（DIG）是从植物洋地黄中提取的，洋地黄还是一种强心药的原料。DIG（Roche Applied Science，Indianapolis，IN）广泛用于合成非同位素标记的探针，是生物素化以外的另一种标记方法。与生物素相同，DIG 标记的探针也可以适用于显色检测法和化学发光法。用随机引物法合成 DNA 探针时，使用 DIG-11-dUTP 时的合成效率最高。用体外转录法合成 RNA 探针时可以使用 DIG-11-UTP。类固醇类半抗原 DIG 通过一个连接臂连接到核苷酸上，或者在寡核苷酸引物合成时在 5′ 端加上 DIG 标记。这种 DIG 标记的寡核苷酸可以掺入 PCR 产物，也可以直接用作核酸杂交探针。不论何种方式，最终标记了 DIG 的分子可以按其他探针一样的方式用作杂交探针。DIG 标记可以通过化学发光法或直接在杂交膜或组织切片上形成不溶的有色沉淀来进行杂交后的检测。

杂交后严谨洗涤杂交膜，然后用酶联免疫检测法检测 DIG 标记的探针，也就是用连接有酶的抗体（例如 anti-DIG-AP 或 anti-DIG-HRP）来检测。与生物素系统的检测原理类似，在化学发光法或显色检测法中，光的发射或沉淀的形成是通过酶切割相应的底物而导致的。

15.3.3 荧光标记的核苷酸

如第 13 章所述，最常用的荧光探针是用 Cy3 或 Cy5 标记的，而不是以往的用 FL 标记的核苷酸（FL 12 dUTP 和 FL 12 UTP）掺入标记。使用这种传统的荧光标记法时，其探针检测及信号产生的机制与 DIG 标记的探针是相似的。杂交后，用抗 FL 的高亲和力抗体对探针定位，然后通过与抗体交联的 AP 或 HRP 进行化学发光或显色来检测。

就直接检测杂交膜上的 FL 探针而言，由于 FL 的荧光猝灭率较高且荧光强度受 pH 值的影响，因此对这种荧光团的定量测定存在问题。虽然新的一些仪器及染料克服了这种方法内在的一些缺陷，但 FL 探针的检测最好还是使用酶联的抗 FL 抗体。

❶ BCIP，5 溴 4 氯 3 吲哚磷酸盐；NBT，氮蓝四唑

15.3.4　直接酶标法

ECL 系统（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ）的特点是修饰过的 HRP 通过戊二醛连接臂直接连接到探针分子上，因此该酶在整个杂交及随后的严谨洗涤过程中都存在。这种标记及检测过程不需要任何半抗原的识别过程，因此可以立刻使用化学发光底物。该法是最为快速的标记及检测方法之一，得到了广泛的使用。

15.3.5　化学发光检测法

化学发光法就是利用氧化反应或水解反应，将化学能转变为可见光。简而言之，化学发光法就是通过化学反应来发光。这种技术提供了一种放射性同位素、荧光技术及显色检测法以外的敏感度高而且性价比好的选择（见表 15.1）。目前，这种技术已应用于许多传统的分子生物学方法，包括 Northern 印迹技术、Southern 印迹技术、集落转膜（plaque lifts）检测和原位克隆杂交。虽然这些方法的基本原理基本相同，但基于化学发光法进行杂交检测的试剂盒还是有所不同，主要是系统的复杂性程度不一样，即所需试剂的数量及产生信号所需操作步骤的繁简程度不一样。

表 15.1　化学发光检测法与放射自显影同位素衰变检测法的比较

检　测　参　数	化学发光检测法	放射自显影同位素衰变检测法
灵敏度	高到极高	极高
分辨率	条带非常锐利清晰	双重条带往往难以分辨
曝光时间	几分钟到几小时	几天到几周
检测	X 射线胶片	X 射线胶片
对健康的危害	相对较低	非常高
标记后探针稳定性	可以稳定存放 1 年	由半衰期而定
杂交后膜的处理	曝光前用检测缓冲液处理	曝光前不需要用缓冲液处理

探针的标记及化学发光法检测决不能影响核酸杂交的参数，这点对放射性标记的探针也是同样重要的。实际上，许多适用于化学发光法检测的标记技术也适用于显色检测法。这两种检测系统的不同点在于底物，这些底物在激活试剂的存在下会变得不稳定。检测化学发光的机制与放射自显影中检测同位素衰变的机制相似。发出的相当强的光，可以在较短的时间内（与放射自显影曝光所需时间相比）在 X 射线胶片上产生一个可定量的图像。

15.3.5.1　化学发光法的底物

大多数化学发光检测体系可以分为两类：使用 AP 的和使用过氧化物酶的[1]。AP 体系里通常使用的底物是 1,2-二氧环己烷衍生物，包括 Lumigen PPD[2]（Lumigen，Inc.，Southfield，MI）、CSPD 和 CDP Star（Applied Biosystems，Foster City，CA）。其他的 AP 底物（主要是二氧环己烷衍生物）也相继研发出来，这些获得专利的 1,2-二氧环己烷试剂在小牛肠 AP（Bronstein 和 McGrath，1989）的催化下能迅速转变为发光的产物。最终发出的蓝光（≈470nm）强度与 AP 的量成正比（图 15.3）。Applied Biosystems 还提供一种化学发光增强剂，这些试剂适用于许多分子生物学实验。

---

[1] β-半乳糖苷酶和荧光素酶虽然通常只用于报告基因检测，但也适用于化学发光检测法。

[2] 从化学上看，Lumigen PPD 是 4-甲氧基-4-(3-磷酸苯基）螺环（1,2-二环氧己烷-3,2′-金刚烷）磷酸氢二钠盐。

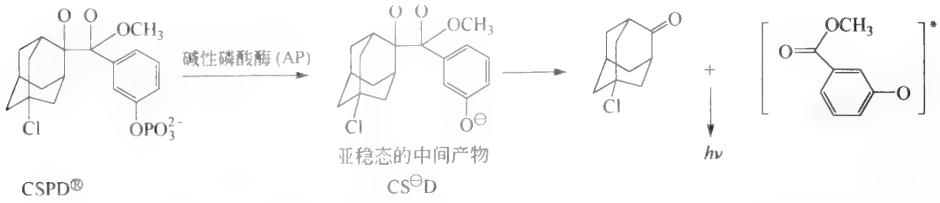


图 15.3 碱性磷酸酶催化二氧环己烷底物去磷酸化，而形成亚稳态的酚盐阴离子，后者分解时发出约 480nm 的光。发出的光不断增强到一定的强度为止

三种传统的适用于 AP 系统内含 Lumigen PPD 的试剂为：①Lumi-Phos 530，内带一种荧光增强剂，发光波长可达 530nm；②Lumi-Phos 480，不含荧光增强剂，其余与 Lumi-Phos 530 相同；③Lumi-Phos Plus，内含荧光增强剂，可以增加化学发光的敏感性，发光波长为 470nm。近年来，又出现一种新的 9，10-二氢吖啶底物，即 Lumigen APS-5（Lumigen，Inc）。这种底物具有极高的敏感性，对低至 10^{-20}mol 的 AP 都可检测到，而且发光时间持久，使得检测过程不用太急促。此外，一种产生高强度橙红色光的试剂 Lumi-Phos CCD 已被研发出来，这种试剂使用电荷耦合器件（CCD）相机来检测信号。

过氧化物酶系统所用的底物为 H_2O_2。其中包含的化学反应过程为：H_2O_2 的还原反应产生氧自由基（O_2）和氢气（H_2），这些产物接着促发了环酰肼发光氨[1]（Matthews 等，1985；Thorpe 和 Kricka，1986）或其他多种相关底物的氧化发光反应。在基于发光氨的化学反应中，伴随发光的氧化反应产物是 3-氨基邻苯二甲酸盐和氮气（N_2）（图 15.4）。探针的杂交位置及杂交量通常通过 X 射线胶片曝光记录，这点与放射自显影相似。新的基于过氧化物酶的化学发光检测试剂有 Lumigen PS-atto、Lumigen PS-2 和 Lumigen PS-3（Lumigen，Inc.）。

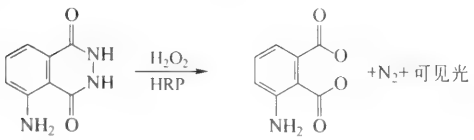


图 15.4 辣根过氧化物酶（HRP）在有 H_2O_2 和发光氨的存在下发生反应产生可见光。在几分钟内发出的光的强度达到高峰，随后急剧减弱

化学发光检测杂交信号一般是一系列复杂操作的最后一步。这些操作包括探针标记、杂交膜的封闭、杂交后的洗膜、杂交膜的第二次封闭、半抗原识别结合、重复洗膜和酶促降解相应的底物。如前所述，化学发光的检测机制是要形成“分子三明治”。例如，生物素化的探针分子通过与链霉亲和素-AP 或链霉亲和素-HRP 反应来定位。DIG 标记的探针则是通过抗 DIG 的酶联抗体来定位。用于检测 FL 标记探针的抗 FL 的抗体也是酶联抗体。然后通过与相应底物孵育而发出可见光。为了记录发光的位置及强度，与底物孵育过的膜立即用塑料膜包裹，然后对 X 射线胶片曝光，这与整体放射自显影非常相似（详见放射自显影部分）。由于没有使用同位素，因此所得图像最好称为化学发光图，而非放射自显影图。

作为一项检测技术，化学发光法最常见的问题是有时背景较高或是完全没信号。造成这样的结果通常是因为：①杂交后以及检测过程中没有洗干净杂交膜；②在加酶联检测试剂之前，膜没有封闭好；③检测过程开始后，膜被晾干过；④佩戴了带滑石粉的乳胶手套（这对 X 射线胶片的处理也不利）。在笔者的实验室，杂交后严谨洗膜、严格遵照

[1] 5-氨基-2,3-二氢-1,4-邻苯二肼甲基二氢酞嗪二酮

厂家推荐的检测操作程序，以及使用无滑石粉手套后显著提高了曝光质量，高敏感度具有很好的重复性。

15.3.6　显色检测法

许多于 20 世纪 80 年代中期出现的显色检测系统都因这样或那样的原因而没能得到广泛应用。随着一些改进的固相（核酸固相化到膜上）化学发光检测方法的出现，显色检测系统已渐渐被冷落。一个值得注目的例外是 DIG 标记系统，如以前人们所熟知的 Genius 试剂盒（Roche Applied Science，Indianapolis，IN），在原位杂交的非同位素检测方法中独树一帜。

在显色检测法及化学发光法的操作过程中，在加酶促底物前，所加的试剂通常是相似的。基于 AP 的显色检测法中，最后一步通常是由酶催化 BCIP 去磷酸化，产物随后与 NBT 反应形成蓝紫色的沉淀直接沉积在杂交膜上。该反应只在存在酶的位置发生，也即杂交的位置。因为没有放射自显影或化学发光过程发生，不需要进行胶片曝光。显色检测过程一般需要长达数小时才能完成。有报道表明某些显色检测系统敏感度低的原因是膜上沉积的有色沉淀抑制了 AP 的活性所致（Pitta 等，1990）。由这种原因导致的酶活性抑制会立即影响到定量分析，最终得到的数据不可靠而且说明不了任何问题。基于 HRP 的显色检测过程，其最后步骤是利用 H_2O_2 和 4-氯-1-萘酚或 TMB[1]。

下面的轶事就说明了显色检测法与化学发光法的相似性：在笔者的实验室，有一次原打算用显色检测法来检测集落转移的膜，操作到最后一步，最后一刻突然决定改加化学发光底物（H_2O_2 和发光氨）而不是原定的 H_2O_2 和 4-氯-1-萘酚。这最后一刻的改变并没有对筛选结果产生负面影响，反之成功地从库中鉴定出了所要的克隆。虽然这种非标准的操作方法不值得推荐，但这个事例恰恰说明了这两种方法的相似性。

对于用显色反应检测过的杂交膜，如果需要再次用探针杂交，必须进行严格的洗膜以去除沉积的有色沉淀以及探针。每一种滤膜及非同位素检测系统都有相应的洗膜方案，用于指导清除以前杂交到膜上的探针，为下一次杂交做好准备。

15.4　数字成像系统

目前，用数字成像系统分析数据已成为许多分子生物学实验室的常规手段。它为图像分析的敏锐性和精确性提供了一个新的尺度。用软件和数字成像系统分析图像需要较大的投资，虽然还需要升级和售后服务，但这样的花费是一次性的。如果实验室或研究所里没有后文所述的一些高端仪器，可以进行一个临时的电子转换步骤，即将 X 射线胶片或凝胶图像转拍为数字图像，然后用独立的图像分析软件如 Gel-Pro（Media Cybernetics，Silver Spring，MD）客观地测量条带的分子量和强弱。

现在许多商家提供数字成像系统，其中包括著名的 Archiver Eclipse 工作站（FOTODYNE，参见第 11 章中图 11.5）。目前可购得的这些系统功能齐全，从扫描湿胶、处理图像到完全取代 X 射线胶片。有些系统可以直接从凝胶及印迹膜上捕获图像，完全不需要胶片，然后进行电子分析并存档。

[1] TMB：3,3′,5,5′-四甲基对二氨基联苯。

磷屏成像仪是一种成熟的敏感度很高的成像设备，其主要功能就是从凝胶及印迹上获取数字图像。第一台仪器于 20 世纪 80 年代后期上市，由当时的 Molecular Dynamics 公司生产，原先是为定量分析凝胶上的放射活性而设计的。现今两个比较熟知且口碑良好的磷屏成像仪是 Typhoon 和 Storm（Amersham Biosciences）。这些磷屏成像仪可以定量分析荧光（例如溴化乙锭、SYBR 绿、SYBR 金）、化学发光和放射性衰变（具体功能由仪器型号而定）。现在有些系统还可以分析考马斯亮蓝和银染的凝胶。其应用已扩展到微阵列技术领域。

磷屏成像仪的图像捕获方式比较独特，该仪器有许多优点。首先，不需要用 X 射线胶片。如在印迹分析时，在一块可重复使用的屏上产生图像。这种屏在正确维护下可以无限次地使用。它的曝光时间是 X 射线胶片的 1/10。磷屏成像检测技术完全适用于对核酸、蛋白质及任何带有荧光或放射性标记的大分子的定性分析和定量分析。其最大的优点是敏感性极高，是 X 射线胶片的 5～10 倍。而且，不用 X 射线胶片也意味着克服了胶片成像的固有缺点——线性范围窄。磷屏成像仪能达到 5 logs 的线性范围，从而其定量分析结果能较真实地反应样品间的差异。

由于磷屏成像仪的普及性问题，许多院系或研究所只有一台仪器，使用者经常需要预约登记才能使用仪器。进行高通量实验的实验室，或者有多个研究生的实验室，仪器的使用时段往往只限于早上的短短几小时。

15.5 参考文献

Bonner, W. M. (1987). Autoradiograms: ^{35}S and ^{32}P. *Methods Enzymol.* **152,** 55.

Bonner, W. M., and Laskey, R. A. (1974). A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46,** 83.

Bronstein, J., and McGrath, P. (1989). Chemiluminescence lights up. *Nature* **338,** 599.

Cimino, G. D., Gamper, H. B., Isaacs, S. T., and Hearst, J. E. (1985). Psoralens as photoreactive probes of nucleic acid structure and function: Organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **54,** 1151.

Denman, R. B., and Miller, D. L. (1989). Use of photobiotinylated deoxyoligonucleotides to detect cloned DNA. *BioTechniques* **7,** 138.

Forster, A. C., McInnes, J. L., Skingle, D. C., and Symons, R. H. (1985). Non-radioactive hybridization probes prepared by chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Res.* **13,** 745.

Hofman, K., and Finn, F. M. (1985). Receptor affinity chromatography based on the avidin-biotin interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **447,** 359.

Laskey, R. A., and Mills, A. D. (1977). Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett.* **82,** 314.

Leary, J. J., Brigati, D. J., and Ward, D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80,** 4045.

Matthews, J. A., Batki, A., Hynds, C., and Kricka, L. J. (1985). Enhanced chemiluminescent method for the detection of DNA dot-hybridization assays. *Anal. Biochem.* **151,** 205.

McInnes, J. L., Dalton, S., Vize, P. D., and Robins, A. J. (1987). Non-radioactive photobiotin labeled probe detects single copy genes and low abundance mRNA. *Nat. BioTechnol.* **5,** 269.

Pitta, A., Considine, K., and Braman, J. (1990). Flash™ chemiluminescent system for sensitive nonradioactive detection of nucleic acids. *Strategies Mol. Biol.* **3(3),** 33.

Randerath, K. (1970). An evaluation of film detection methods for weak β-emitters, particularly tritium. *Anal. Biochem.* **34,** 188.

Swanstrom, R., and Shank, P. R. (1978). X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I. *Anal. Biochem.* **86,** 184.

Thorpe, G. H., and Kricka, L. J. (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.* **133,** 331.

Wassarman, D. A. (1993). Psoralen crosslinking of small RNAs *in vitro*. *Mol. Biol. Rep.* **17,** 143.

Wilchek, M., and Bayer, E. A. (1984). The avidin-biotin complex in immunology. *Immunol. Today* **5(2),** 39.

Zagursky, R. J., Conway, P. S., and Kashdan, M. A. (1991). Use of ^{33}P for Sanger DNA sequencing. *BioTechniques* **11,** 36.

（史毅译；赵波涛校）

第 16 章　核酸酶保护法定量测定特定的 mRNA

16.1　基本原理

稀有或低丰度转录产物的研究是分子生物学实验室中一项频繁而重复的工作。Northern 分析最多只是半定量的方法，尽管在转录产物丰度不低于检测水平时，通常这种方法确实能提供转录产物的信息，包括天然大小、自特定位点转录的不同转录产物的数量等。Northern

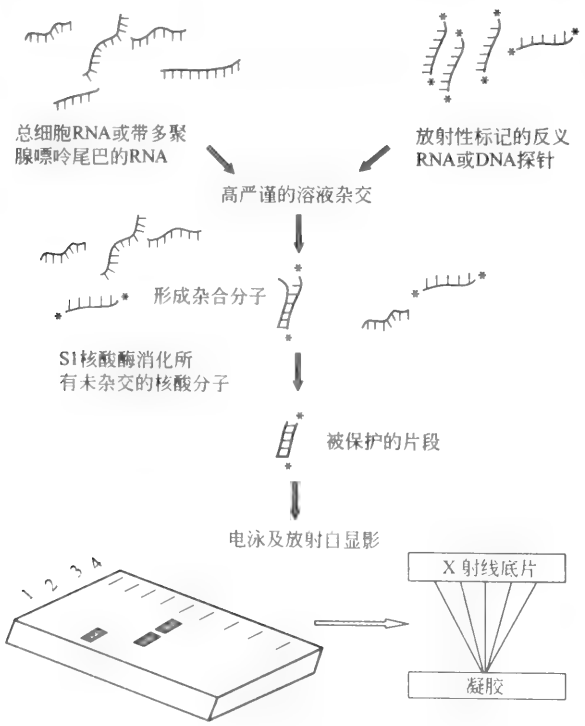


图 16.1　用 S1 核酸酶定量分析特异的 RNA。纯化的 RNA 和一个标记的探针序列在溶液中杂交形成热稳定的杂交分子。用单链特异的 S1 核酸酶消化掉所有没有参与形成杂交分子的 RNA 和探针，随后电泳分析未被消化的杂交分子。把凝胶直接放射自显影，就可以根据结果推知被保护片段的大小和丰度。泳道 1：未消化的探针。泳道 2 和泳道 3：实验样品。泳道 4：分子量标准

分析的灵敏度和分辨率常受限于多种因素，如在凝胶上不能加大量的 RNA 样品、从凝胶转到印迹膜的低效率和非特异交叉杂交。非特异交叉杂交可发生在探针与具有一定同源性的转录产物之间，以及膜上的靶序列与随探针带来的载体序列之间等。而且，一个根本的缺点是膜杂交不能保证完全的杂交，因为一部分膜上结合的靶序列不能完全接触到探针。不管从理论还是从实践来讲，完全的杂交即使可能，要实现也是很困难的。

克服 Northern 印迹这些缺点的一个基本办法，就是一般所提到的核酸酶保护实验。核酸酶保护实验是定量特异转录产物非常灵敏和精确的方法。在这种方法中，探针和靶 RNA 间的杂交双链是在高严谨度条件下以溶液杂交的方式进行的。研究者可以选择全细胞 RNA、全细胞质 RNA、poly(A)$^+$ mRNA 或其他 RNA 作为起始的靶材料。增强这些方法的灵敏度常常不需要富集 poly(A)$^+$ mRNA。杂交反应产物随后用一种单链特异的核酸酶消化，这种核酸酶一般没有双链分子（如 DNA：RNA 或 RNA：RNA 杂合体）的亲和力。因此，任何未掺入双链的探针、靶 RNA 分子都被降解，最终被保护的片段可以用乙醇沉淀回收。通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射自显影（图 16.1 和图 16.2）或磷屏定量等方法，杂交分子的大小和数量能被推断出来。这个技术的一些改变方案中，测定未降解分子的数量可用液闪计数法代替。

凭借探针和靶溶液杂交的优势，以及随后其他所有未参与双链形成的序列的降解，信噪

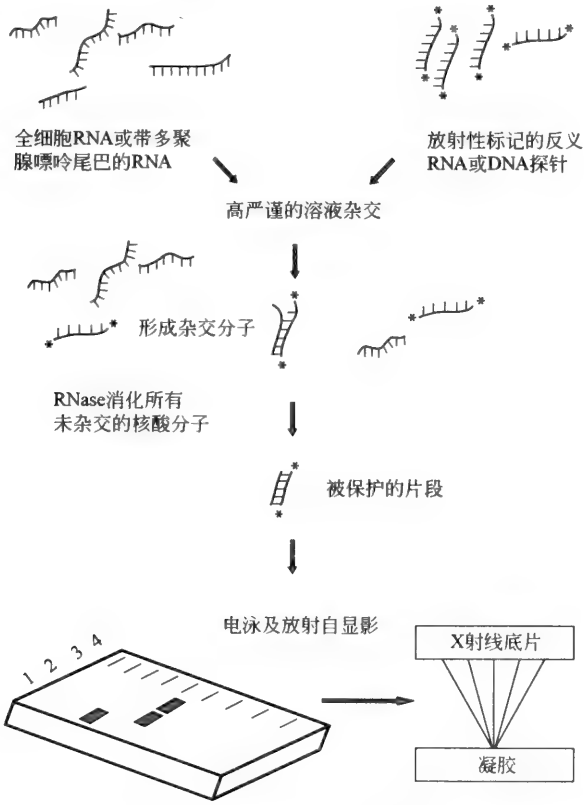


图 16.2　RNase 保护分析。纯化的 RNA 和一个标记的反义 RNA 探针序列在溶液中杂交形成热稳定杂交分子。用 RNase 混合物消化掉所有保持单链的分子。把凝胶直接放射自显影，就可以根据结果推知被保护片段的大小和丰度。泳道 1：未消化的探针。泳道 2 和泳道 3：实验样品。泳道 4：分子量标准。实验的一般流程同 S1 核酸酶保护分析

比得以增强，这种增强常常是非常显著的。用高比放射性（比放）的探针经过 3 天压片曝光，研究者可以预期获得相对于传统印迹分析至少高 10 倍的灵敏度，并可高重复性地检测少至 5fg 的靶 RNA[1]。而且，通过激酶反应可以掺入 5′高比放射性（比放）标记的探针（$>10^9$ cpm/μg），这种高比放射性（比放）探针可以精确地测定转录产物的 5′末端（Boorstein 和 Craig，1989）。核酸酶保护分析过去也被用来测定外显子的边界（Weaver 和 Weissman，1979）。所有能被标准 Northern 分析所定量研究的转录产物，都能用更灵敏的核酸酶保护分析轻易地检测出来。分析来自不同样本的少量 RNA 时，核酸酶保护分析就显得尤为便利。最后，核酸酶保护分析是一个广泛接受的可信的独立方法，它能验证反转录聚合酶链反应（RT-PCR）的结果，比如鉴定一个假想的转录起始位点、转录产物丰度的改变等。

16.2 基本方法

多种核酸酶和方法被用于定量和鉴别特异的转录产物，并比 Northern 分析获得更多的信息。不同方法的选择主要取决于特定研究所要解答的问题。可用的酶有核酸酶 S1（Ando，1966；Vogt，1973）、绿豆核酸酶（Kowalski 等，1976）和核酸酶Ⅶ（Chase 和 Richardson，1974a，1974b）。不同的方法包括以 RNase A 和 RNase T_1 组合为特征的 RNase 保护分析（Zinn 等，1983；Melton 等，1984；Lee 和 Costlow，1987）、引物延伸（McKnight 和 Kingsbury，1982；Jones 等，1985；Kingston，1988）和核逃逸实验。很大程度上，聚合酶链反应已经代替了这些技术，然而，S1 核酸酶保护分析和 RNase 保护分析（RPA）仍然是流行的可信的技术。其关键的好处是它们不需要反转录步骤（详见第 18 章和第 19 章）。

当第一次被提出时，核酸酶保护的基本方法描述了直接针对靶 RNA 的双链 DNA 探针及 S1 核酸酶消化未保护的序列（Berk 和 Sharp，1977，1978）。该方法扩展到使用 RNA 探针也已很长时间了。使用双链 DNA 探针时极其重要的一点是，杂交过程中要抑制探针的复性，因而要求凭借经验决定合适的杂交温度。杂交常常在含有高浓度甲酰胺的缓冲液中进行。此时，杂交速度大约为在简单水溶液中的$\frac{1}{12}$（Casey 和 Davidson，1977）。然而，保持小的杂交体积和高的核酸浓度，仍能使杂交在几个小时内完成。更重要的是，甲酰胺环境倾向于产生很低的背景，因为它能更有效地促进 RNA：DNA 双链的形成，而非互补 DNA 链的复性。

因为双链探针存在潜在的复性可能，所以单链探针的使用毫无疑问更受欢迎。此外，杂交温度须略低于形成杂合分子所预期的解链温度（T_m）。因为理论上 DNA：DNA、RNA：DNA 和 RNA：RNA 分子中的单链区域（错配和悬垂）会被选择性除去，所以如果形成非最适的探针和靶分子间的杂交分子，就会无法鉴定出“杂交窗口”，从而产生误导的信息。

S1 核酸酶是从丝状真菌 *Aspergillus oryzae* 中分离得到的一种天然存在的糖蛋白。它是进行这类分析的最廉价的酶，在 RNA 图谱分析中能与绿豆核酸酶互换使用。S1 核酸酶是一种锌依赖[2]的酶（Ando，1966；Vogt，1973），对单链或不完全配对的多聚核酸结构具有很高的特异性。任何单链的 DNA 或 RNA 区域能被以外切和内切的方式降解，产生 5′-单核苷酸和 5′寡核苷酸。其活性定义为 1 个单位酶量，在 37℃条件下，1min 内生成 1μg 酸可溶

[1] 放射自显影被认为是最灵敏的方法，但也有报道用化学发光的核酸酶保护实验可检测少至 30fg 的 RNA。

[2] Co^{2+} 也可作为有效的辅助因子（Vogt，1973）

性脱氧核糖核酸。它降解 DNA 的速度比降解 RNA 的速度快 5 倍。pH4.5 左右和相对高的离子强度❶时，它表现出最佳的核酸酶活力，而在 pH7.2 时基本无活力（Linn 和 Roberts，1982）。S1 核酸酶也表现出热稳定性的特征（Ando，1966），尽管在很多应用中，温浴常被控制在较低的温度（37℃）。而且，S1 核酸酶能抵抗包括甲酰胺、SDS 和尿素等变性剂（Vogt，1973；Hofstetter 等，1976），这些特性增加了 S1 核酸酶的可用性。

尽管具备这些特征的酶拥有很多优势。但在使用 S1 核酸酶时也有一些潜在的困难。S1 核酸酶是一个很剧烈的酶❷。因此，很多研究者更喜欢用 RPA 而非 S1 核酸酶保护分析。实验方案部分是最有可能需要优化的一步。任何时候，典型的使用范围在 100～200U/ml 反应体积内。根据不同供应商，S1 核酸酶的浓度在每微升 20～500U 不等。过量的酶活力会导致杂合分子的不稳定和快速降解，天然不稳定的富含 AT 和 AU 的区域也特别容易受 S1 核酸酶的攻击。如果存在切口的话，也会在非预期的低分子区段产生条带。如果出现这种情况，解决的办法是降低酶的用量。而且，因为酶的最高活力需要低的 pH 值，而在这种环境下长时间温浴会导致双链 DNA 脱嘌呤化。

核糖核酸酶保护分析（RPA）的基本方法（见图 16.2）与 S1 核酸酶分析（见图 16.1）的完全相同：用于溶液杂交的是一个互补于所要研究 RNA 转录产物的探针，杂交后，降解过量探针和所有未被保护的 RNA。从分子机制的角度看，应当注意的是，在 S1 核酸酶分析中，NA 或 RNA 探针都可以使用，因为 S1 核酸酶是单链特异的酶，它并不在意底物是 DNA 或 RNA。表 16.1 比较了 S1 核酸酶和 RNase 保护分析这两种很相近的技术。在 RPA 中，是用 RNase A 和 RNase T_1 的混合物来进行消化，这就要求使用反义 RNA 探针。RNase A 是单链 RNA 的内切核糖核酸酶，特异的切点在嘧啶（胞嘧啶和尿嘧啶）核苷酸的 3′侧（Py/pN）。最终降解产物都是嘧啶 3′-磷酸，即所有分子都带有 3′-磷酸基团的嘧啶结尾。RNase T_1 也是一个单链特异的内切核糖核酸酶，切割鸟嘌呤 3′端的磷酸二酯键（GpN），如同 RNase A 一样，产生 3′-磷酸结尾的寡核苷酸。这两个酶的一些性质总结在表 16.2 中。

表 16.1　S1 核酸酶和 RNase 保护分析的比较

项　目	S1 核酸酶保护分析	RNase 保护分析	项　目	S1 核酸酶保护分析	RNase 保护分析
靶	RNA	RNA	背景	低到中等	中等到高
探针	DNA 或 RNA	RNA	可控性	很难	中等困难
核酸酶	S1 核酸酶	RNase A+RNase T_1	平均灵敏度极限	100fg	50fg

表 16.2　RNase A 和 RNase T_1 的比较

酶	典型的储存浓度	底物①	活　性	来　源
RNase A	2mg/ml	单链 RNA	靶分子的嘌呤(C 和 U)；切割嘌呤 3′端的磷酸二酯键(Py/pN)；产生 3′-磷酸基团	牛胰腺
RNase T_1	10U/μl	单链 RNA	靶分子的胞嘧啶核苷酸；进攻胞嘧啶 3′端的磷酸二酯键(GpN)；产生 3′-磷酸基团	*Aspergillus oryzae*；克隆的基因在 *Escherichia coli* 中表达

① 当用过量的酶消化过长时间，也会进攻双链 RNA。

❶ 某些应用中，使用高浓度酶。此时需增加实验溶液的离子强度，以限制双链 DNA 分子产生缺口，使用高浓度酶时，常观察到这种缺口。200mmol·L NaCl（Vogt，1973）和比最适 pH 稍高的 pH 值，可抑制双链 DNA 上缺口的形成。

❷ S1 核酸酶的剧烈降解特性部分源自 mRNA 不能全部转化成双链互补 DNA(cDNA)。Gubler 和 Hoffman（1983）建立的广为流行的方法大大改进了 cDNA 合成的效率。在此以前，分子生物学不能制备全长的 cDNA。这就是在 PCR 出现以前的日子里，是怎样合成 cDNA 的。

从策略的角度来看，把核酸酶保护反应多元化，即在一个反应试管中使用多个探针，是很流行的做法。这种想法就是，只要探针呈现相似的热力学行为，并且被保护的片段大小不同，它们就可以同时分析，从而产生不同大小的条带对应于每一个被保护的片段，所有条带出现在凝胶上的单一泳道（图 16.3）。

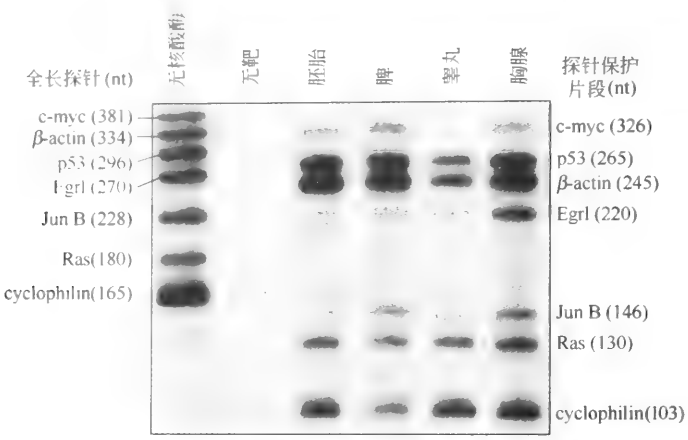


图 16.3　10μg 的不同组织的总 RNA 和各 50000cpm 的七个不同探针杂交过夜。经核酸酶消化，产物在 6％的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离后，－80℃样片曝光 4h 检测杂交水平。用 Ambion 的 MAXscript 试剂盒和 [α-^{32}P] UTP（800Ci/mmol，10mCi/ml）在 5μl 的反应体系中标记探针，杂交前纯化。通过加入合适量的非放射性 UTP，将 cyclophilin 和 β-actin 的比放射性（比放）分别降低至原来的$\frac{1}{20}$和$\frac{1}{200}$

16.3　探针选择

很多与误杂交和探针复性所产生的问题，可通过使用单链核酸探针得以避免。利用高效、低成本的完整体外转录系统，可以迅速得到大量特定序列的高比放单链探针。这是现在最常用的制备单链探针的方法（用于核酸酶保护分析）。可供选择的方法还包括寡核苷酸的合成、老旧的克隆到 M13 载体的方法和不对称的 PCR，但这些方法用得比较少。在使用单链探针的时候，探针的复性就不再成为问题了，但在非严谨和半严谨的条件下分子内的碱基配对仍然存在。

来自于体外转录的单链探针几乎总是混有至少是少量的用于转录的模板 DNA。当存在 DNA 模板和临近的载体序列时，它们都可能与探针杂交并保护全长的探针不被 S1 核酸酶降解，由此造成人为带入的杂交，它们都可能在放射自显影时被看到。而且，这种情况下，会大大降低参与形成 RNA：RNA 或 DNA：RNA 杂合物的自由探针的浓度。尽管高严谨度的杂交溶液能够在一定程度上减弱这些现象，但并不能完全消除它们，除非除去探针中的载体序列（可以通过电泳或 DNase Ⅰ消化、乙醇沉淀这种理想的方法来除去模板。最后，如果不能保持大大过量的探针的话，这种检测的灵敏度将很难实现。

Northern 分析和核酸酶保护分析的另一个主要不同是，电泳和放射自显影后观察到的条带的分布位置不同。在经典的 Northern 分析中，观察到的信号代表了转录产物的天然大小。比如，人类癌基因 *c-myc* 的主要转录产物 mRNA 的长度是 2.4kb。同样地，这个转录

产物预期出现在高丰度的两个核糖体 RNA（rRNA）中间，略高于 18S rRNA 的位置。相反，核酸酶保护产生的杂交分子仅和探针一样长。如果探针和靶分子上没有直接参与杂交分子形成的核苷酸都被消化的话，杂交分子常会比探针更短（图 16.4）。因此，核酸酶保护分析比 Northern 更能容忍 RNA 样品的部分降解，因为只要靶分子上探针所识别的部分是完整而无损的就可以了；而一个转录产物上的单个切点就可以导致这个分子不能被标准的 Northern 分析检测到。在一个计划周全的实验中，检测到的核酸酶消化后的杂交分子的长度（被保护的片段）应该短于未杂交或复性的（探针和模板）分子。在标准的实验条件下，电泳能够轻易区分核酸酶处理后的分子量差异小至 10%的不同分子。

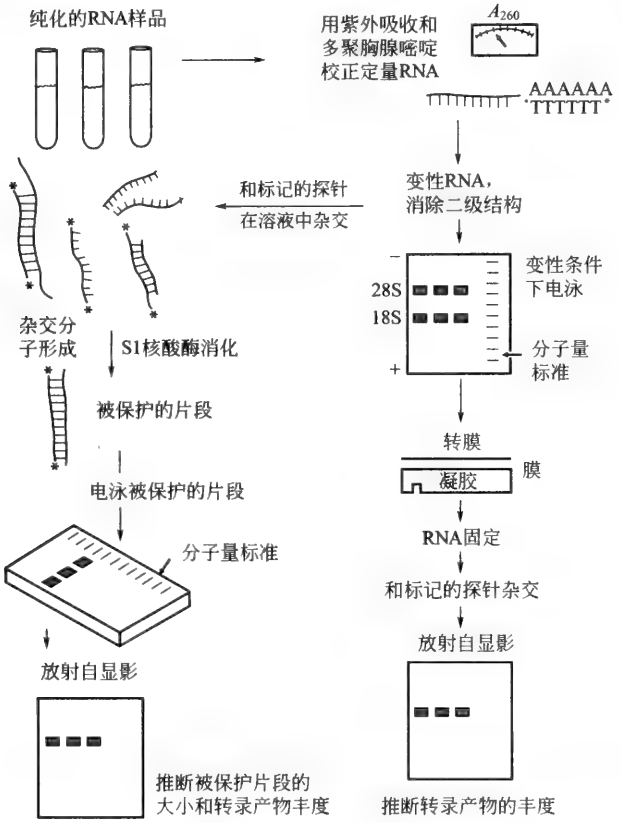


图 16.4　S1 核酸酶保护分析和传统的 Northern 分析定量特异的 RNA 转录产物的比较

探针标记的方式是需要严格考虑的，尤其当试图第一次鉴定一转录产物时。末端标记的探针（5′或 3′）绝非首选，应当避免，尤其当首次用于鉴定使用的探针。如果带有标记的核苷酸不能直接参与杂交分子的形成，那么标记就会被消化掉，使得杂交分子无法被探测到。使用连续标记的探针（沿着整个分子被标记的探针）可以很快减轻这个问题。长度在 150～450 个碱基的探针效果最好。

正如前面指出的，单链探针能够很容易地通过体外转录得到。要记住的是：对 RNA 探针的操作需要很好的无 RNase 的技术；探针极高比放的放射性会使得探针被辐射裂解[1]。不

[1] 辐射裂解是放射性标记分子被它自己携带的标记物辐射降解的现象。使用非常高的比放射性标记探针（$>1\times10^9$ cpm/μg）时，并且在使用前储存数天时常会发生这种现象。

完整的探针片段会产生增强的背景和非特异性的杂交。强烈建议研究者在每次使用前都要用凝胶检查一下探针的完整性（不管标记与否）。

16.4 优化建议

探针类型和标记方法建立后，根据经验决定随后的杂交参数，将有助于保持大多数定量核酸酶保护分析的保真度。为了使核酸酶保护分析更易达到最高的可重复的灵敏度和分辨率，给出了下面的一些建议。但因为核酸酶保护分析的试剂很容易以试剂盒的形式获得，所以这里所列的有些优化步骤并不是必须的。如果需要调整的话，一个优化的流程常常也只需要一次。然而对于每一个新的探针，调整反应常常是需要的。

① 检测某 RNA 群体中特定 mRNA 量的最精确的方法，是用一大大过量的单链探针，在溶液中滴定它，测试相同量探针和一系列不同量的特定 RNA 样品的杂交反应。如果探针是过量存在的话，那么改变靶 RNA 的起始量应当会同比例地改变信号值。

② 靶与探针杂合物的稳定形成肯定是有利的。缺少特定探针在核酸酶保护分析实验中表现行为的详细信息时，首先尝试在 50℃杂交。然后，在不同温度（±5℃、±10℃及更大范围）重复检测，以确定对于各个探针的合适的严谨度。杂交温度应该足够高到能容许杂交分子的形成，但又不会引起杂交分子的解离——即调整杂交温度到低于 T_m 值 5℃。精确的温度估算也依赖于探针本身的特性，记住双链 RNA 分子比 DNA：RNA 杂合体更具有热稳定。因而同样的检测用 RNA 探针能比 DNA 探针经受更高严谨度的杂交条件（第 14 章）。

③ 关于探针的稳定性，应该小心富含 AU 的区域。这些区域内在的不稳定性会导致不完全的杂交，从而会极大地降低信号。一定程度上，可以通过降低杂交缓冲液中的甲酰胺浓度来减轻这个困难，尽管这样会牺牲一定的探针特异性。有报道说，杂交后，在准备消化前，将反应物放在稀释的杂交混合物中 15℃温浴 30min，能使富含 AU 的区域更完全地退火而不会产生非特异杂交。但在这种条件下，这种做法会伴随杂交体积的增大。温浴后，核酸酶消化照常进行。

④ 必须使杂交平衡趋于完全。正如实验方案（见后述）里所建议的，任何时候保持杂交反应中核酸浓度尽可能高是很有帮助的。可以通过加入载体 RNA（如廉价的酵母 RNA、tRNA 等）来实现。在特定的时间间隔，取一小份反应产物进行 S1 核酸酶消化，可以经验性地确定杂交反应进行的情况。当杂交信号强度不再增强的时候，说明杂交反应已经达到完全。

⑤ 正式的核酸酶消化必须以可控的方式有效地进行。对于 S1 核酸酶分析，这是尤其重要的考虑因素。S1 核酸酶是一个很剧烈的酶；但幸运的是，现在不同批次之间的活性差异与几年前相比已不再是个问题了。如果实验的这部分出现问题的话，改变 S1 核酸酶的量，使探针能被完全降解而不影响杂交信号。如果不清楚所准备的 S1 核酸酶的活性水平，那么在对有价值的实验样品进行 S1 核酸酶分析前，先进行活力滴定的预实验是有帮助的。如同大多数分子生物学的酶一样，S1 核酸酶保存在含有 50%甘油的合适的储存缓冲液中，并且附带 10×反应缓冲液。典型的 1×反应缓冲液包含 50mmol/L 乙酸钠（pH4.5）、280mmol/L NaCl、4mmol/L $ZnSO_4$ 和 5%甘油，反应在 37℃进行。冻干的 RNase 不同于买来可立即用的 RNase 混合物，它一般需要先滴定并优化其用量。

⑥ 核酸酶保护定量转录产物的一个最常见的问题是与使用反义转录产物有关。体外转

录合成的探针一般都是设计的相对较短的反义转录产物。问题是并非所有反义转录产物都是全长的。因此，混合的非均一长度的探针会产生小于预期的杂交分子，放射自显影时会出现明显的多于一条的条带。新转录出来的 cRNA 在用作探针前先进行凝胶纯化，能在一定程度上减轻这一问题。而且实验刚开始时，实验样品的相邻泳道单独电泳一份未消化的探针来确定全长探针的位置是一个明智的做法。

16.5　可能的困难

核酸酶保护分析法建立后的几年里，尽管 S1 核酸酶的活性比较剧烈，它仍比 RNase 保护分析更容易控制，后者由于产生高背景而饱受诟病。产生这种现象的一个原因是，当时实验所用到的各种成分都是自己生产的，没有很好的质量控制来保证每种成分与其他成分一起使用时表现良好。然而现在大多数研究者宁愿花钱去买一个完整的系统，这些系统都是经过测试确保在正确使用时能有最佳的表现。

但是现在伴随这些实验的困难仍然存在，通常会遇到下面罗列的一个或多个。

① 过高的背景。当使用新的探针或一套新的试剂时，这个问题可能会更严重。过高的背景看起来就像整条泳道的长长的拖尾，这常常是因为不完全消化引起的。但是，在凝胶边缘观察到远高于对应于被保护片段条带所在位置的背景污点却是正常的。导致背景升高的常见错误，是在 RNA 高温退火（见后述）后，在杂交温度下温浴过长的时间。过长的温浴时间使一些 RNA 分子有机会重新形成一定程度的二级结构，或使分子间及和非特异靶序列之间形成碱基配对。高效处理样品是这一步的要点。

此外，实验使用部分降解的 RNA 会降低探针的识别能力。偶尔也会看到来自破碎的（由于辐射裂解或核酸酶降解）不新鲜的探针的“噪声”。偶尔会发现，泳道拖尾也可能是由于杂交混合物中加入了大大过量的探针（相对于正常量而言）。此外，假设酶确实把未杂交的探针降解了，那么这些额外的放射性（游离核酸的形式）时常会在凝胶的边缘折射出很大的污点。

最后，研究者可以检查 S1 核酸酶的活力以确保是否和厂商说明书一致，保质期也要检查。还要确定实验用的 RNA 的完整性是否有损。

② 无信号。导致核酸酶保护分析无信号的一般原因有如下 6 个。

a. 探针没有标记到足够高的比放射性。此外，在末端标记时，带有标记物的核苷酸有可能被核酸酶降解。虽然连续标记的探针不太可能会出现这种情况，但也要小心，除非绝对确信标记的核苷酸参与了杂交分子的形成。

b. 实验用的 RNA 可能已经降解了。尽管核酸酶保护分析更能容忍 RNA 样品的部分降解，但是降解不能出现在与探针互补的区域。在对 RNA 样品作任何处理前，必须要确定它的完整性。

c. 对于所用的探针可能使用了过高严谨度的杂交条件。调整的首选方法是大大地降低杂交温度以确定杂交到底能否进行。然后渐渐提高温度直到确定最理想的条件（见“16.4 优化建议”部分）。

d. 沉淀（RNA 样品、探针、载体 RNA）可能没有完全重新溶解，因而一些或大部分样品不能参与杂交反应。实验刚开始时，保持沉淀微微湿润，有助于沉淀完全溶于杂交缓冲液中。在一些极端情况下，核酸沉淀可能在沉淀后的乙醇洗涤过程中丢失。

e. 待研究的细胞不表达特定的目的 mRNA。如果有合适的引物，值得先用 PCR 检测一下，这可以使研究者知道转录产物到底是否存在。尽管 S1 核酸酶保护分析前富集具有多聚腺苷酸尾巴的mRNA会有少许帮助，但也存在潜在的负面作用——由于这种富集过程先天的低效率，会进一步减少目的低丰度 mRNA，还将不具多聚腺苷酸尾巴的 RNA 种类排除在分析之外。此外，研究者可能知道的另一个可选的方法，是诱导或重复诱导目的特定基因。RNA 样品的杂交能力可以用不同探针来测试，最好是针对相当高丰度的看家基因。通过这样的测试可以确定 RNA 样品至少有无杂交的能力。

f. 粗心地使用了一个正义的而非反义的探针。

③ 背景很好，但有太多条带。如果这是实验的唯一困难，那么优化它就只需要很小的一点调整。出现多条明确的条带，可能缘自于在杂交反应中有和探针同源的 DNA。来自于体外转录的反义分子常常带有质粒模板序列。载体或模板序列是很大的，并且为了体外转录都已线性化，所以它的条带一般位于紧靠加样孔的地方。因而在进行核酸酶保护实验之前，用 DNase Ⅰ消化破坏模板，明显比其他实验更重要，RT-PCR 是例外。此外，杂交的严谨度足够宽松，能容许探针和一些相关的转录产物杂交，这些相关的 mRNA 也许是同一个基因家族的不同成员。如果有这样的相关分子，可以看到相当有趣的（或者是糟糕的）条带谱型出现，谱型的特征依赖于同源物的相似程度及错配的数目和分布。要探究这种可能性，可以将杂交温度从出现多个条带的温度提高 5℃。这个程序上的简单改变，可以使错配杂交分子不稳定，进而降低或消除这些杂带。最后，当 S1 核酸酶分析时，用变性双链 DNA 作探针，由于探针的复性，也会出现多个条带。因为这个原因，很多研究者更喜欢用 RNA 探针来检测靶 RNA 序列。

16.6 实验方案：S1 核酸酶保护分析法定量转录产物

要记住的最重要一点是，进行 S1 核酸酶分析的方法不是一成不变的。这里给出的是，在 Quarless 和 Heinrich（1986）的方法基础上改动和修改的一个方法。用这个方法可以检测少至几百飞克（fg）的特定 mRNA，相当于 100μg 总 RNA 中具有多聚腺苷酸尾巴的 mRNA的 2×10^{-5}%。

① 戴上手套。整个实验中都要使用无 RNase 的材料、试剂和技术。纯化的 RNA 总是很容易被 RNase 降解。

注意 在开始这个实验前一定要检查 RNA 样品的浓度、纯度和完整性。

② 在一个微量离心管中，混合 20～30μg 的细胞 RNA 和足够量的载体 RNA[1]，使总量达到 100μg。加入大约 1×10^{6} cpm 的探针。用二乙基焦碳酸酯（DEPC）处理的水把反应体积调整到 100μl。一定要准备一个只含有载体 RNA 和探针的负对照，负对照应该没有被保护的片段。

注意 1 尽管一些研究者用多至 50μg 的 RNA 起始，但常常从 10μg 的总细胞 RNA 或总细胞质 RNA 起始就足以定量很多 mRNA 了。本方法所用的 S1 核酸酶的量足以消化掉留在反应体系中的所有未杂交的 RNA 和探针。

注意 2 要严格确保探针在摩尔比上至少 5～10 倍的过量。大多数情况下，加入 1×10^{6} cpm 的探针

[1] 用酵母 RNA 储存液用 0.1mol·L⁻¹ NaAc、pH5.2 的缓冲液配置成 1mg·ml⁻¹ 的浓度。液体储存于－20℃。

就可以达到这个要求。

③ 加入 11μl pH5.2、3mol/L 乙酸钠和 250μl 冰冷的 95%的乙醇共沉淀样品、载体和探针。－20℃放置过夜。

注意　没加入探针的实验 RNA 和载体共沉淀后，可以在杂交缓冲液里－80℃保存近 1 周。

④ 离心收集沉淀。弃上清液，沉淀用 70%乙醇（含 30%DEPC 处理的水）洗涤。弃乙醇（放射性废液），倒置离心管晾干沉淀。作为可选项目，用 95%乙醇再洗一次沉淀，可以加速沉淀的晾干。用乙醇保持 RNA 沉淀微微湿润。

注意　不要使用真空泵抽干或使沉淀完全干燥。这样的话，RNA 将会极难溶解。

⑤ 沉淀重新溶于 20μl S1 杂交缓冲液中（80%新鲜的去离子甲酰胺；40mmol/L PIPES，pH6.4；400mmol/L NaCl；1mmol/L EDTA，pH8.0）。上下吹吸样品至少 20 次，确保完全溶解。

注意 1　如有必要，溶解沉淀的杂交缓冲液体积可以增加到 30μl。

注意 2　杂交缓冲液可以事先准备，分成每份 1ml，保存于－80℃。

注意 3　如果实验 RNA 和载体是事先混合而没有加入探针（不推荐），先把探针加到沉淀里，然后再加入杂交缓冲液到终体积 20μl。

注意 4　检测低丰度 mRNA 时，有必要使 RNA 浓度接近溶解的极限（5mg/ml＝100μg/20μl），以尽可能地促进杂交。

注意 5　杂交缓冲液含 80%新鲜的去离子甲酰胺是标准形式。如果用 DNA 作探针，杂交分子的热动力稳定性不如 cRNA 探针，这时可以用少至 40%～50%甲酰胺代替。记住严谨度可以通过温度、盐离子强度、pH 值和甲酰胺的浓度来调节。

⑥ 85℃水浴加热 RNA 样品 10min，使其完全变性。

注意　必须要确保样品完全变性，因为 RNA 的二级结构会影响杂交分子的形成。

⑦ 快速离心 5s 将杂交混合物收集到管底。把离心管立刻置于预热好的 50℃或其他事先确定温度的水浴保温 3h。

注意 1　杂交温度是直接根据所用探针的类型（RNA 或 DNA）、探针的长度和（G＋C）含量的不同而改变的，必须靠经验确定。本方法里，典型的温度范围是 45～60℃。在缺少特定探针的经验或信息时，首先从 50℃开始尝试。

注意 2　如果反应体系中没有加入载体 RNA（见步骤②），有必要大大延长杂交的时间，这意味着要达到较高的杂交效率可能需要温浴过夜。

⑧ 用 160μl DEPC 处理的水稀释反应混合物。加入 20μl 10×的随 S1 核酸酶买来的反应缓冲液。如果没有预制的缓冲液，那么就配制普通的 10×缓冲液（500mmol/L 乙酸钠，pH4.5；2.8mol/L NaCl；40mmol/L $ZnSO_4$[1]；50%甘油）。

⑨ 加入足够的 S1 核酸酶到酶的终浓度为 200～400U/ml。实际需要的体积会随不同的厂家和不同的批次而改变。

注意 1　200μl 的消化体系中，不要超过 10μl 的 S1 核酸酶，因为过高浓度的甘油会抑制酶的活性。如果不得已的话，加入少一点的核酸酶单位，延长消化时间来达到完全消化。

注意 2　实验的这一部分比起其他部分，更有可能需要优化。记住杂交分子中富含 AU 的区域是比

[1] 如提供的酶被保存在含 $ZnCl_2$ 的储备液里，氯化锌必须被 S1 核酸酶消化缓冲液中的 $ZnSO_4$ 代替。

较脆弱的。如果存在切口的话，也会出现明显的非预期的低分子量条带。如果出现这种情况，调整的方法是降低酶的使用量。

⑩ 短暂离心将所有液体收集到管底，37℃温浴 1h。

⑪ 用等体积的酚：氯仿：异丙醇（25：24：1）或酚：氯仿（1：1）混合物抽提反应物。最高速离心 2min 分层。

⑫ 小心地把水相（上层）转移到一个新的离心管中。加入 1μl 20mg/ml 的糖原（糖原终浓度为 100μg/ml）。加入 2.5 倍体积 95%的乙醇，沉淀在核酸酶消化反应中被保护的杂交分子。

⑬ 将离心管在干冰上放置 15min 或－20℃ 2h。

⑭ 离心收集沉淀。小心弃上清液风干沉淀。也可以用真空泵稍微抽干，但一定不能使沉淀过干。

⑮ 用 5μl TE 缓冲液（10mmol/L Tris；1mmol/L EDTA，pH8.0）悬起沉淀。

⑯ 加入 5μl 2×甲酰胺上样缓冲液（50%甲酰胺，2×TBE 缓冲液，0.2%溴酚蓝）。95℃加热 3min，然后置冰上 2min。用 1×TBE❶作电泳缓冲液，5%～6%的聚丙烯酰胺/8mol/L 尿素凝胶上电泳，常压 250V 电泳直到染料接近凝胶底部。

可选方案：样品中加入等体积 2×上样缓冲液（125mmol/L Tris，pH6.8；10%甘油；0.2%溴酚蓝）。5%～6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，或根据预期被保护片段的大小使用合适比例的凝胶电泳（附录 13，附表 13-1）。用 1×TBE❶作电泳缓冲液。常压 250V 电泳直到染料前沿到达或接近凝胶的底部。

⑰ 电泳结束后，抽干胶，－70℃用增感屏进行放射自显影（见第 15 章）。作为可选，当使用的是高比放探针时，可以把凝胶用塑料纸包裹后，在上面覆盖一张柯达的底片进行放射自显影。

16.7 实验方案：RNase 保护分析法定量转录产物

如前面方法所指出的，用 RNase 保护分析转录产物也没有一成不变的规则。指导原则是高严谨度的杂交条件。与用 DNA 探针的 S1 核酸酶保护实验相比，使用 RNA 探针的 RPA 提供更强的靶分子热稳定性和更强的识别能力。这里给出的操作程序是修改版之一，事实上所有的东西都可以以试剂盒的形式买到。经过优化，本操作程序的灵敏度可达到 0.1pg 或更高。尽管非放射性的替代标记和检测方法也有，但放射性标记仍然是具有最高灵敏度和分辨率的方法。

① 戴上手套。整个实验中都要使用无 RNase 的材料、试剂和技术。纯化的 RNA 和来自体外转录的 RNA 探针总是很容易被 RNase 降解。

② 按照不同的体外转录系统（如 Roche Applied Science 或 Promega）或其他所描述的系统（如 Gilman，1987；Sambrook 和 Russell，2001），克隆探针的序列到一个噬菌体的启动子下游。准备和纯化反义的 RNA 探针。

③ 用本书介绍的任何一种方法，分离纯化所要研究的细胞 RNA 或组织 RNA。

注意 在开始这个实验前一定要检查 RNA 样品的浓度、纯度和完整性。

❶ 1×TBE 缓冲液：90mmol/L Tris；90mmol/L 硼酸；1mmol/L EDTA，pH8.0。

④ 在一个微量离心管中，混合 20～30μg 的细胞 RNA 和足够量的载体 RNA，使总量达到 100μg。加入大约 1×10^6 cpm 的探针。用 DEPC 处理的水把反应体积调整到 100μl。一定要准备一个只含载体 RNA 和探针的负对照，负对照应该没有被保护的片段。

注意 1　尽管一些研究者用多至 50μg 的 RNA 起始，但常常从 10μg 的总细胞 RNA 或总细胞质 RNA 起始，就足以定量很多 mRNA 了。本方法所用的 RNase 的量足以消化反应体系中所有未杂交的 RNA 和探针。

注意 2　要严格确保探针至少 5～10 倍的过量。大多数情况下，加入 1×10^6 cpm 的探针就可以达到这个要求。

⑤ 加入 11μl pH5.2、3mol/L 乙酸钠和 250μl 冰冷的 95%的乙醇共沉淀样品、载体和探针。－20℃放置过夜。

注意　没加入探针的实验 RNA 和载体共沉淀后，可以在杂交缓冲液里－80℃保存近 1 周。

⑥ 离心收集沉淀。弃上清液，沉淀用 70%乙醇（含 30%DEPC 处理的水）洗涤。弃乙醇（放射性废液），倒置离心管晾干沉淀。作为可选项目，用 95%乙醇再洗一次沉淀，可以加速沉淀的晾干。用乙醇保持 RNA 沉淀微微湿润。

注意　不要使用真空泵抽干或使沉淀完全干燥。这样的话，RNA 将会极其难溶。

⑦ 把沉淀重新溶于 20μl RPA 杂交缓冲液中（80%新鲜的去离子甲酰胺；40mmol/L PIPES，pH6.4；400mmol/L NaCl；1mmol/L EDTA，pH8.0）。上下吹吸样品至少 20 次，确保完全溶解。

注意 1　如有必要，溶解沉淀的杂交缓冲液体积可以增加到 30μl。

注意 2　杂交缓冲液可以事先准备，分成每份 1ml，保存在－80℃。

注意 3　如果实验 RNA 和载体是事先混合的而没有加入探针（不推荐），先把探针加到沉淀里，然后再加入杂交缓冲液到终体积 20μl。

注意 4　要检测低丰度的 mRNA 时，有必要使 RNA 浓度接近溶解的极限（5mg/ml＝100μg/20μl），以尽可能地促进杂交。

注意 5　杂交缓冲液含 80%新鲜的去离子甲酰胺是标准形式。记住严谨度可以通过温度、盐离子强度、pH 值和甲酰胺的浓度来调节。

⑧ 85℃加热 RNA 样品 10min，使其完全变性。

注意　必须要确保样品完全变性，因为 RNA 的二级结构会影响杂交分子的形成。

⑨ 快速离心 5s 将杂交混合物收集到管底。把离心管立刻置于预热好的 50℃或其他事先确定温度的水浴保温 3h。

注意 1　杂交温度是直接根据所用探针的长度和（G＋C）含量的不同而改变的，必须靠经验确定。本方法里，典型的温度范围是 45～60℃。在缺少特定探针的经验或信息时，首先从 55℃开始尝试。

注意 2　如果反应体系中没有加入载体 RNA（见步骤④），有必要大大延长杂交的时间，这意味着要达到较高的杂交效率可能需要温浴过夜。

⑩ 杂交结束后，加入 240μl 无菌水稀释反应混合物。再加入 30μl 10×RNase 缓冲液（100mmol/L Tris，pH7.5；3mol/L NaAc；50mmol/L EDTA，pH8.0）。随后加入 5μl 2mg/ml RNase A 和 5μl 10U/μl RNase T_1。

注意 1　如果在第⑦步用多于 20μl 的 RPA 杂交缓冲液，一定要按比例增加水和 10×RNase 缓冲液

的体积。

注意 2 RNase A 的终浓度应该近似 50μg/ml，RNase T_1 为 200U/ml。

⑪ 短暂离心将所有液体收集到管底，37℃温浴 1h。

⑫ 用等体积的酚：氯仿：异丙醇（25：24：1）或酚：氯仿（1：1）混合物抽提反应物。最高速离心 2min 分层。

⑬ 小心地把水相（上层）转移到新的离心管中。加入 1μl 20mg/ml 的糖原（糖原终浓度为 100μg/ml）。加入 2.5 倍体积的 95%的乙醇沉淀杂交分子。

⑭ 将离心管在干冰上放置 15min 或－20℃ 2h。

⑮ 离心收集沉淀。小心弃上清液风干沉淀。也可以用真空泵稍微抽干，但一定不能使沉淀过干。

⑯ 用 5μl TE 缓冲液（10mmol/L Tris；1mmol/L EDTA，pH8.0）悬起沉淀。

⑰ 加入 5μl 2×甲酰胺上样缓冲液（50%甲酰胺，2×TBE 缓冲液，0.2%溴酚蓝）。95℃加热 3min，然后置冰上 2min。用 1×TBE[1] 作电泳缓冲液，在 5%～6%的聚丙烯酰胺/8mol/L 尿素凝胶上电泳，常压 250V 电泳直到染料接近凝胶的底部。

可选方案：样品中加入 2×上样缓冲液（125mmol/L Tris，pH6.8；10%甘油；0.2%溴酚蓝）。5%～6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，或根据预期被保护片段的大小使用合适比例的凝胶电泳（附录 13，附表 13-1）。用 1×TBE 作电泳缓冲液。常压 250V 电泳直到染料前沿到达或接近凝胶的底部。

⑱ 电泳结束后，抽干胶，在－70℃用增感屏进行放射自显影（见第 15 章）。作为可选，当使用高比放探针时，可以把凝胶用塑料纸包裹后，在上面覆盖一张柯达的底片进行放射自显影。

16.8 参考文献

Ando, T. (1966). A nuclease specific for heat-denatured DNA isolated from a product of *Aspergillus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta* **114,** 158.

Ausserlechner, M. J., Sgonc, R., and Wick, G. (1998). Chemiluminescence-based RNase protection assays for simultaneous quantification of procollagen mRNAs containing AU-rich regions. *BioTechniques* **24,** 366.

Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12,** 721.

Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1978). Spliced early mRNAs of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75,** 1274.

Boorstein, W. R., and Craig, E. A. (1989). Primer extension analysis of RNA. *Methods Enzymol.* **180,** 347.

Casey, J., and Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentration of formamide. *Nucleic Acids Res.* **4,** 1539.

Chase, J. W., and Richardson, C. A. (1974a). Exonuclease VII of *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **249,** 4545.

[1] 1×TBE 缓冲液：50mmol/L Tris；50mmol/L 硼酸；1mmol/L EDTA，pH8.0。

Chase, J. W., and Richardson, C. C. (1974b). Exonuclease VII of *Escherichia coli*. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **249,** 4553.

Gilman, M. (1987). Ribonuclease protection assay. *In* "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Eds.), pp. 4.7.1–4.7.8. John Wiley & Sons, New York.

Gubler, U., and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25,** 263.

Hofstetter, H., Schambock, A., Van Den Berg, J., and Weissmann, C. (1976). Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA)·poly (dT) method. *Biochim. Biophys. Acta* **454,** 587.

Jones, K. A., Yamamoto, K. R., and Tjian, R. (1985). Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter *in vitro*. *Cell* **42,** 559.

Kingston, R. E. (1988). Primer extension. *In* "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Eds.) pp. 4.8.1–4.8.3, John Wiley & Sons, New York.

Kowalski, D., Kroeker, W. D., and Laskowski, M. (1976). Mung bean nuclease I. Physical, chemical, and catalytic properties. *Biochemistry* **15,** 4457.

Lee, J. J., and Costlow, N. A. (1987). A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels. *Methods Enzymol.* **152,** 633.

Linn, S., and Roberts, R. R. (1982). "Nucleases." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

McKnight, S. L., and Kingsbury, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217,** 316.

Melton, D. A. Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1175.

Quarless, S. A., and Heinrich, G. (1986). The use of complementary RNA and S1 nuclease for the detection of low abundance mRNA transcripts. *BioTechniques* **4,** 434.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (Eds.). (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Vogt, V. M. (1973). Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **33,** 192.

Vogt, V. M. (1980). Purification and properties of S1 nuclease from *Aspergillus*. *Methods Enzymol.* **65,** 248.

Weaver, R. F., and Weissman, C. (1979). Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: The 5′ termini of 15S β-globin mRNA precursor and mature 10S β-globin mRNA have identical map coordinates. *Nucleic Acids. Res.* **7,** 1175.

Weigand, R., Godson, G., and Radding, C. (1975). Specificity of the S1 nuclease from *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Chem.* **250,** 8848.

Zinn, K., DiMaio, D., and Maniatis, T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β-interferon gene. *Cell* **34,** 865.

（赵波涛译；李洋校）

第 17 章　核 RNA 分析

17.1　基本原理

核 RNA 的分析分为两个方面。首先，对不同位点转录效率的分析可以为在既定条件下一个模型系统中基因行为的假设论证提供关键证据。为此，一种叫作核逃逸实验的方法可用来检测基因的转录效率。第二，核逃逸分析的定量可以由稳态核 RNA 的 Northern 分析检测提供。它也是研究核不均一 RNA（hnRNA）加工途径的极有价值的工具。表 17.1 中列出了传统 Northern 分析、核酸酶保护法、核逃逸实验和反转录聚合酶链反应（RT-PCR）的比较。

表 17.1　传统 Northern 分析、核酸酶保护法、核逃逸实验和 RT-PCR 的比较

项目	Northern 分析	核酸酶保护法	核逃逸实验	RT-PCR
优点	为 RNA 分析提供定性组分； 支持用不同的探针多次杂交； 适用于全 RNA、胞质 RNA 或 poly(A)$^+$ RNA； RNA 在膜上相对稳定； 能够监测样品的完整性	比 Northern 分析的灵敏度高很多； 比其他分析方法需要更少的 RNA 操作； 能够允许部分降解的 RNA； 溶液杂交比膜杂交更加量化； 能够用于稳态或转录效率检测	检测转录的相对比率； 保持了染色质的天然几何构型； 允许同时研究多个基因； 结合 Northern 分析数据，能用于检测基因的转录或转录后调控	合理设计能达到无与伦比的灵敏度； 提供无与伦比的解析度； 取代很多经典技术； RNA 用量最小； 十分迅速的技术； 满足研究产出率
缺点	是灵敏度最差的方法； 变性剂有毒害； 需要大量 RNA 操作； 耗费时间多； RNA 酶的降解机会很多； 只能检测稳态 RNA	被保护的片段比原始片段小； 核酸酶，尤其是 S1 核酸酶，难以控制； 精确的杂交参数比其他方法敏感； 如果发生二次退火，双链探针可能损害定量效果	核的分离要求很多技巧； 探针复杂度非常高； 在杂交中，没有标记的内源 RNA 能与标记了的 RNA 竞争； 在标记过程中，方法的原理是支持转录延伸而不是起始	与其他方法相比，对精确的反应成分和条件更加敏感； 对污染物，尤其是基因组 DNA，极其敏感； 必须注意遗留物污染； 优化可能会耗时耗财

17.2　转录速率的检测

对关键调节分子的调控是细胞应对内外刺激的一种整体细胞应答。定量测定基因表达的变化和阐明目的基因在哪个水平上受到调节，是分析一个生物模式体系的基本目的。虽然潜

在的调节层次是无限的，但大体上可以分为转录水平调控或某种转录后事件的调控。对这些系统的初步分析通常涉及分离、杂交、随后用 Northern 分析检测特定的 RNA、核酸酶保护以及聚合酶链反应（PCR）等相关技术（分别见第 12 章、第 16 章、第 19 章和第 20 章）。虽然这些方法可以在稳态水平的信息方面（即 RNA 最终在细胞质或细胞核或两者中的积累）提供很好的定性和定量数据，但是从整个细胞裂解物中制备的 RNA 既不能提供关于目的 RNA 转录速率信息，也不能提供该 RNA 分子在细胞内的区域划分（细胞核或细胞质）方面的信息。对于阐明基因调控水平来说，这方面的细胞生物化学知识是必要的，因为很多信使 RNA（mRNA）的半衰期比其他信使 RNA 长很多，而且很多 mRNA 的半衰期会因异生化合物治疗或环境刺激应答而发生剧烈变化。

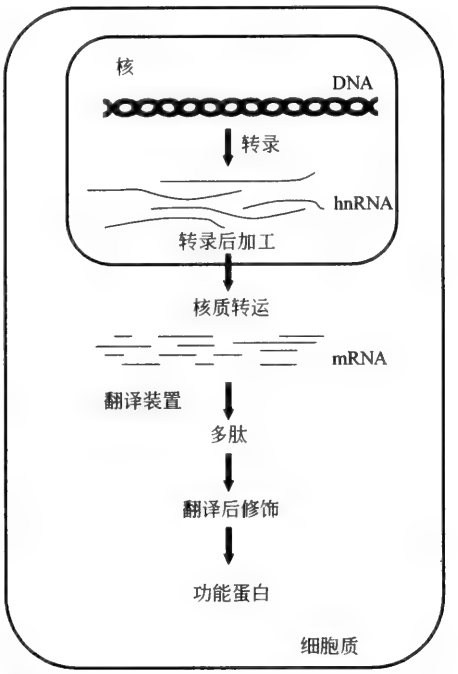


图 17.1　信使 RNA（mRNA）的生物合成。由 RNA 聚合酶Ⅱ转录基因产生核不均一 RNA（hnRNA），即 mRNA 的直接前体。细胞内影响 mRNA 成熟的生化变化本质上可归为转录或转录后的，取决于它在何处实施影响。细胞核或细胞裂解仅产生那些已经积累的转录物；为了估测转录物合成的比率，可以进行核逃逸实验

多种因素会影响成熟 mRNA 分子在细胞质中的含量和可翻译性，其中包括（但不局限于）调控因子及反式和顺式作用的序列。转录效率、转录速率、前体 hnRNA 分子的剪接效率、核质转运以及 mRNA 对蛋白质翻译体系的可及性，是一些潜在的基因调控水平。这些调控最终控制着表型的显现（图 17.1）。

针对这些问题，有两种基本方法被用于研究真核细胞特定基因的转录机制与后续初级转录产物的加工。其中一种方法是，在完整的细胞核中，标记的前体核糖核苷酸掺入分离细胞核时已经在内源染色质上起始转录的 RNA 转录本，以此来衡量转录的比率。因而，在内源染色质上的转录延伸产生了标记了的核 RNA。这些标记了的核 RNA 接下来被纯化，并与互补的固定在膜上的靶 DNA 杂交。这种广泛使用的技术被称为核逃逸实验（Marzluff，1978；Marzluff 和 Huang，1984；Kanazawa 等，2000），它是一种非常灵敏的测定动物和植物细胞中转录速率的方法。转录速率代表着细胞状态的功能（图 17.2）。另一种方法是用特定的克隆了的 DNA 片段作为转录模板（Manley，1984；Krämer 等，1987），它被用来剖析为保证完整的细胞抽提物在体外忠实转录所必需的因子和序列。

核逃逸实验的主要优点是标记的同时维持着转录工厂的天然几何构型。然而，由于核逃逸实验产生的是没有经过剪接的前体 RNA，这些 RNA 分子在转录后的命运并不清楚。核逃逸实验所使用的体系和反应条件能促进已经起始了的转录本的延伸，但是并不认为它能支持新的起始事件[1]。任何特定 RNA 种类的标记程度（它代表特定基因组序列的相对转录速率）可以通

[1] 数量巨大的没有标记的内源核 RNA 能够竞争性地干扰新合成的 RNA 的检测。这是该方法不支持核生物化学的一方面。转录起始的定量在别处已有详述（Marzluff 和 Huang，1984，pp. 103-119）。

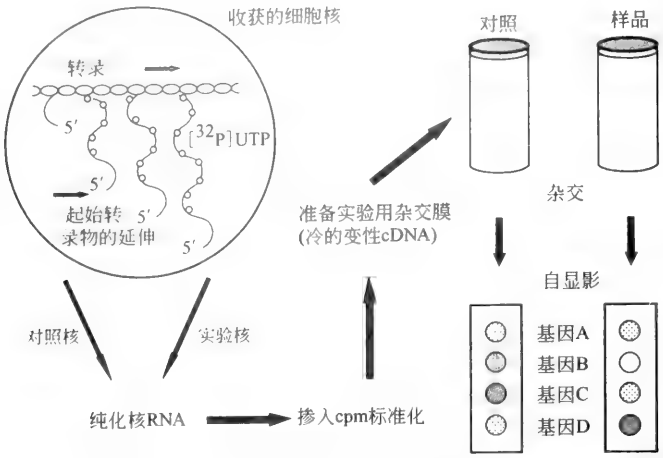


图 17.2　核逃逸实验。所有基因的相对转录比率可以通过将完整的细胞核与一种含有放射性标记的 UTP 的核苷三磷酸（NTP）混合剂共孵育而测定

过与放射自显影相耦联的 Cerenkov 计数来估计。另外，如果掺入的是非同位素标记物，可用显色或化学发光的方法来检测。在既定的实验条件下，这些数据与参与转录某一特定基因的 RNA 聚合酶分子的数量直接相关，并且间接与目的基因相关联的调控序列的转录效率相关。与细胞质 RNA 组分的 Northern 印迹分析法（见“17.3.2 用 NP-40[1] 缓冲液裂解细胞”）联用时，核逃逸实验得到的数据可用来评估所观察到的基因调节来自哪方面的变化——合成（转录调控）、剪接、核质转运或是 mRNA 稳定性（转录后调控）。

核逃逸实验允许同时检测多个特定基因组位点的转录活性，假定所有位点在分离核中以等同于完整细胞中的相对数量进行转录。这是该技术最主要的优点。因为一个“典型”的真核细胞在细胞周期的任何指定时间点活跃地转录着数以千计的不同基因，标记了的 RNA（在本方法中作为异质探针）有非常大的复杂度[2]；在此实验中转录出的目的 RNA 序列的浓度可能仅是大量探针中很小的一部分。尽管如此，由于以下原因这种方法的灵敏度非常高。

① 标记的 RNA 是单链（双链探针的复性会减少探针在杂交溶液中的有效浓度）。

② 延伸过程中 RNA 被连续标记产生极高的特异活性（与末端标记的探针相比，第 13 章）。

③ 与 RNA：DNA 和 DNA：DNA 杂合体相比，RNA：RNA 杂合体增强了热力学稳定性，允许非常严谨的杂交后洗涤，从而增加了信噪比。

核逃逸实验由几个不同的阶段组成，每个阶段有不同的目的。

① 分离细胞核。目的在于分离可以支持转录延伸的完整的核。

② 在存在标记了的核苷三磷酸（NTP）前体的情况下延伸转录物。目的是标记初始转录物的同时维持转录装置的几何构型。

③ 回收标记了的转录物。目的是从新标记的 RNA 中去除蛋白质和 DNA。

④ 用标记了的 RNA 与特异的固定在膜上的靶 DNA 杂交。目的是仅使对应于互补

[1] 诺乃洗涤剂 P-40（Nonidet P-40），目前的商品名是 Igepal CA-630。

[2] 复杂度是指作为探针的不同 RNA 序列的总长。

DNA（cDNA）的标记转录物参与杂交。能同时检测的基因数目没有限制。

⑤ 用放射自显影和/或 Cerenkov 计数来定量。目的是估计目的基因的相对转录速率。杂交信号与目的 RNA 在所有转录的 RNA 库中的量相关。表 17.2 是报告这些数据的一个典型示例。

表 17.2　细胞癌基因对细胞形状的依赖性

细　胞　系	增 殖 表 型	接 触 抑 制	相对转录比率			
			c-ras	*c-myc*	*c-fos*	*c-fes*
CUA-1	形态依赖	+	30.0	16.0	0.92	0.93
HT-1080	非形态依赖	−	0.86	0.67	0.93	0.92
HT-IFN^R	形态依赖	+	0.38	0.51	0.64	0.66

注：数值反映扁平细胞中基因特异的核转录物的丰度除以培养在醇溶性聚合体多［HEMA］上的圆细胞中转录物的丰度。丰度水平来自核逃逸放射自显影的图像分析（Farrell 和 Greene，1992）。

核逃逸实验成功度几乎完全依赖于从完整细胞中分离细胞核及前体 UTP 放射性标记的速度。最关键的参数是在标记前制备细胞核。在标记步之前，对细胞核处理方面的经验不足通常直接导致不能得到高比活性的 RNA 探针。从体外培养的细胞（Marzluff 等，1973，1974）或（如果绝对必要）从组织（Ernest 等，1976）中分离细胞核的过程中，还必须保持 RNA 聚合酶的活性和核结构。文献中记载的大多数方案仅是在标记后纯化 RNA 的步骤有所不同。分离内源染色质并使之保持 RNA 聚合酶活性的方法文献中也有记载（最初描述于 Marzluff 和 Huang，1975）。

总的来说，细胞核的分离是通过完整细胞在低渗裂解缓冲液中孵育，该裂解缓冲液的特点是含有温和非离子去垢剂 NP-40（Price 和 Penman，1972；Greenberg，1988）；或在含有 Triton X-100 等渗蔗糖缓冲液（Marzluff 等，1973，1974）中孵育；或用非水相的方法[1]（Gurney 和 Foster，1977；Lund 和 Paine，1990）而获得。然后细胞核可以立即用于标记，或置于细胞冻存安瓿中在液氮[2]或−80℃冻存几个月，标记能力不会有明显下降。不要将微量离心管放置在液氮中。

17.3　实验方案：核逃逸实验[3]（新生 mRNA 分析技术）

17.3.1　细胞收集及细胞核的制备

在笔者的实验室里，起始标记反应前，将细胞尽可能保持于低温下，这样可获得最佳的标记效果。用 2 或 3 个大托盘（如那些经常用于瓶子高压灭菌的）盛满冰，本方案前三个步骤中可以将组织培养皿直接放置于冰上。这样排除了必须在冷冻室里工作的不适。此外，将细胞培养在 100mm 或 150mm 培养皿中而不是培养在组织培养瓶中，可以大大加快从培养皿中收获细胞的速度。

① 将细胞培养液从培养有贴壁细胞的培养皿中吸去。

---

[1] 分离细胞核的非水相方法包括组织或细胞的冻干，例如在甘油溶液中将干粉匀浆，然后在非水缓冲液中沉淀细胞核。

[2] 若不熟悉液氮、液氮真空瓶以及试管冻融的安全操作方法，应该寻求有这方面经验的人的指导。这对实验室每个人的安全是必需的。

[3] 在这里列举的方案是对 Groudine 等（1981）、Nevins（1987）和 Greenberg（1988）方法的改进。

注意 虽然在一个标记反应中可能只用 5×10^6 个细胞核，但较为明智的是用 $(3\sim5)\times10^7$ 个细胞核起始以达到高效标记。核标记必须要达到足够的每分钟计数（cpm），以利于杂交时测量 RNA 样品。可以用血细胞计很方便地对细胞核和细胞进行计数。

② 用 10～15ml 冰冷的磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）洗涤单层细胞一次。倒掉大部分 PBS，留下约 1ml 在组织培养的容器中。

③ 用无菌细胞刮子或橡皮滴管温和而迅速地刮取收获细胞。

注意 1 细胞可以用胰蛋白酶消化来收获❶。但笔者历经曲折最终认识到，这个方法中过度胰蛋白酶消化会大大降低标记效率。

注意 2 虽然在“半转化”细胞群体中 hnRNA 的合成好像没有受到细胞形状扭曲的影响，这种细胞形状的扭曲毫无疑问会伴随胰蛋白酶的消化（Ben-Ze'ev 等，1980）而产生。对二倍体细胞而言，即使是微小的形态变化也会使其 RNA 合成显示出较强烈的形态反应（Benecke 等，1978；Wittelsberger 等，1981）。由于这个原因，从放置在冰上的培养皿中刮下细胞是最不可能导致细胞形状扭曲的方法，因而强烈推荐。

注意 3 置预冷转子中，4℃、500×g 离心 5min 收集悬浮细胞，弃上清液。用 10ml 冰预冷的 1×PBS 重悬细胞，再按上述步骤收集。尽可能完全地去除上清液，然后接步骤⑤。

④ 将细胞转移至预冷的离心管（如一个 15ml 或 30ml 无核酸酶的 Corex 玻璃管），4℃、500×g 离心 5min 收集细胞。尽可能完全地去除上清液。

注意 1 转移装有细胞和/或细胞核的试管时，进离心机前和出离心机后都要将试管置于冰桶中。

注意 2 当置入离心机转子的时候，要保证用合适的橡皮套支撑玻璃管。

17.3.2 用 NP-40 缓冲液裂解细胞

⑤ 重悬细胞前，非常温和地振荡 5s 使细胞团块松散。缓慢加入 NP-40 缓冲液（10mmol/L Tris，pH 7.4；10mmol/L NaCl；5mmol/L $MgCl_2$；0.5% NP-40），同时温和振荡。冰浴 5min。

注意 这个技术要避免形成细胞团块。

⑥ 4℃、500×g 离心 5min 收集细胞。

注意 如果需要，细胞质 RNA 可以从细胞质上清液中纯化出来用于 Northern 分析。将上清液置于冰上，然后继续处理细胞核。

⑦ 按照步骤⑤所述，用 4ml NP-40 缓冲液重悬细胞核团块。4℃、500×g 离心收集细胞核。

⑧ 小心倒出并舍弃上清液。用 200～300μl 甘油储存缓冲液（50mmol/L Tris，pH 8.0；30% 甘油；2mmol/L $MgCl_2$；0.1mmol/L 乙二胺四乙酸）温和振荡如步骤⑤。细胞核可以立即用于标记或者置于密封的细胞冻存安瓿中于液氮或－80℃保存几个月。

17.3.3 细胞核制备的备选方案：从组织培养的细胞中分离易损细胞核❷

在这个方法中，用等渗蔗糖缓冲液裂解细胞，然后吸入一个黏稠的蔗糖缓冲当中来制备细胞核。这种方法通过阻止细胞核撞击到离心管底部来保持细胞核的完整性。记住不同细胞类型的细胞核密度不同，对特定细胞类型必须要优化条件以便能纯化到细胞核。同前述方

❶ 胰蛋白酶消化的方案见附录 10。

❷ 由 Marzluff 和 Huang（1984）的方法修改而来。

案，当细胞培养在 100mm 或 150mm 的组织培养皿中而不是培养在组织培养瓶中时，将大大加快从组织培养皿中收获细胞的速度。

① 将细胞培养基从长有贴壁细胞的培养皿中倒出，舍弃。

注意　用 $(3\sim5)\times10^7$ 细胞核起始产生足够的 cpm，以利于杂交时测量 RNA 样品。用血细胞计很方便地对细胞核和细胞进行计数。

② 用 15ml 冰冷的磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）洗涤单层细胞一次。倒掉大部分 PBS，留下约 1ml 在组织培养的容器中。

③ 用无菌细胞刮子或橡皮滴管温和而迅速地刮取收获细胞。

注意 1　细胞可以用胰蛋白酶消化来收获[1]。但是过度的胰蛋白酶消化会大大降低标记效率。

注意 2　虽然在“半转化”细胞群体中 hnRNA 的合成好像没有受到细胞形状扭曲的影响，这种细胞形状的扭曲毫无疑问会伴随胰蛋白酶的消化（Ben-Ze'ev 等，1980）而产生。对二倍体细胞而言，即使是微小的形态变化也会使其 RNA 合成显示出较强烈的形态反应（Benecke 等，1978；Wittelsberger 等，1981）。由于这个原因，从放置在冰上的培养皿中刮下细胞是最不可能导致天然细胞形状扭曲的方法，因而强烈推荐。

注意 3　在室温下 $500\times g$ 离心 5min 收集悬浮细胞。弃上清液。可选：用一份冰冷的 PBS 洗涤细胞团块一次，并按先前所述收集。尽可能完全地去除上清液，然后接步骤⑤。

④ 将细胞转移至一个合适的离心管（如 15ml 或 30ml 无核酸酶的 Corex 玻璃管），室温下 $500\times g$ 离心 5min 收集细胞。尽可能完全地去除上清液。

注意 1　转移装有细胞和/或细胞核的试管时，进离心机前和出离心机后都要将试管置于冰桶中。

注意 2　当置入离心机转子的时候，要保证用合适的橡皮套支撑玻璃管。

⑤ 以 1×10^7 个细胞/ml 的密度用预冷的缓冲液 I［0.32mol/L 蔗糖；5mmol/L $CaCl_2$；3mmol/L 乙酸镁；0.1mmol/L EDTA；0.1% Triton X-100；1mmol/L 二巯基苏糖醇（DTT）；10mmol/L Tris，pH 8.0］重悬细胞。

注意　这个缓冲液可以预先配制好，但是在使用前再加 DTT 和 Triton X-100。

⑥ 在杜恩斯匀浆器中匀浆细胞，用紧密结合的杵最多匀浆 10 次。

注意　通常导致标记掺入低的原因是使用结合不紧密的杵，从而不能释放大量的细胞核。

⑦ 无 RNA 酶的离心管底部 1/3 放置缓冲液 II（2mol/L 蔗糖；3mmol/L 乙酸镁；1mmol/L DTT；10mmol/L Tris，pH 8.0）做缓冲垫。确保所使用的离心管能够经受超离心。用适量的缓冲液 II 稀释匀浆物使得体积足够充满离心管剩余的 2/3 体积。小心地将得到的混合物铺到缓冲垫上。

⑧ 4℃、$30000\times g$ 离心 45min 收集细胞核。

⑨ 以 10^8 个细胞核/ml 的密度用储存缓冲液（40%甘油；5mmol/L 乙酸镁；0.1mmol/L EDTA；5mmol/L DTT；50mmol/L Tris，pH 8.0）重悬细胞核团块。

⑩ 立即将细胞核封存于细胞冻存安瓿管中于液氮或－80℃保存几个月。否则，立即开始标记方案。

17.3.4　细胞核制备的备选方案：从完整组织中分离细胞核[2]

① 按照标准方法获得组织。迅速切碎组织并用冰冷的 0.14mmol/L NaCl、10mmol/L

[1] 胰蛋白酶消化的方案见附录 10。

[2] 从 Derman 等（1981）、Marzluff 和 Huang（1984）的方法修改而来。

Tris（pH 8.0）溶液洗涤。

② 在冰冷的裂解缓冲液（0.32mol/L 蔗糖；5mmol/L $CaCl_2$；3mmol/L 乙酸镁；0.1mmol/L EDTA；0.1% Triton X-100；1mmol/L DTT；10mmol/L Tris，pH 8.0）中匀浆切碎的组织。每克组织加 5ml 裂解缓冲液。

③ 迅速将匀浆用几层灭菌纱布过滤。这会有助于去除结缔组织和其他碎片。

④ 杜恩斯匀浆器中用一个紧密结合的杵匀浆 10～20 次。取 5μl 匀浆液于显微镜载玻片上，盖上盖玻片，用显微镜观察细胞裂解的程度。

⑤ 在匀浆液中加入 1～2 体积预冷的（2.0mol/L 蔗糖溶液[1]；3mmol/L 乙酸镁；0.1mmol/L EDTA；1mmol/L DTT；10mmol/L Tris，pH 8.0）溶液。无 RNase 的离心管底部 1/3 部分由上述相同缓冲液组成缓冲垫。把上述得到的混合物铺到该缓冲垫上。确保所使用的离心管能够经受超离心。

⑥ 4℃、30000×g 离心 45min 收集细胞核。

⑦ 以 10^8 个细胞核/ml 的密度用甘油储存缓冲液（25% 甘油；5mmol/L 乙酸镁；0.1mmol/L EDTA；5mmol/L DTT；50mmol/L Tris，pH 8.0）重悬细胞核团块。

⑧ 立即将细胞核封存于细胞冻存安瓿中于液氮或－80℃保存几个月。否则，立即开始标记方案。

17.3.5 转录物的标记

注意 在融化细胞核之前配制好 2×反应缓冲液非常重要。即使让融化了的细胞核待在冰上几分钟也会使标记效率大大降低。

① 配制 2×反应缓冲液（10mmol/L Tris，pH 8.0；5mmol/L $MgCl_2$；300mmol/L KCl；1mmol/L ATP；1mmol/L CTP；1mmol/L GTP；5mmol/L DTT）。

注意 理想情况下，应该从任意一个零售商那里买到一种 NTP 储存液，然后在使用之前加到反应缓冲液中。如果需要，用足够的 0.5mmol/L EDTA 溶解，使其终浓度达到 100mmol/L；调整 pH 值至 7.0～8.0。制备单独的 NTP 储存液。将核苷酸储存液分装并保存于－20℃，一份只冻融一次。NTP 的最小浓度是 50μmol/L，通常工作浓度在 0.5～1.0mmol/L 范围内。

② 每 200μl 细胞核加入 200μl 2×反应缓冲液。如果细胞核在使用之前是冻住的，加入 200μl 2×反应缓冲液到 200μl 融化的细胞核中。

注意 1 在本实验室中，最佳标记效率是在装有冻着的细胞核的安瓿中加入 200μl 2×反应缓冲液时观察到的，细胞核直接在 2×反应缓冲液中融化。不要在细胞核融化后洗涤，而且一份只能融化一次。

注意 2 如果融化了的细胞核显得黏稠不要过度惊慌。虽然冻融以后的细胞核会有一定裂解，但转录复合物仍然完好而且能够支持已经起始了的转录物的延伸以及标记物的掺入（Marzluff 和 Huang，1975；Nevins，1987）。当然，为了减少细胞核的损伤，在标记之前的每一步都应当小心翼翼。

③ 立即加入 10μl [α-^{32}P] UTP 800 Ci/mmol，10mCi/ml，然后 26℃孵育 30min，同时温和振荡。

注意 1 标记可直接在冷冻的安瓿中进行。此外，新制备的细胞核最好在一圆锥形的聚丙烯试管中标记，这样可以降低此方法必然产生的放射性照射到最小程度。

[1] 确切的蔗糖浓度因所研究的细胞类型的不同而异，在使用有价值的起始材料之前，应该根据经验测定好。通常范围是 1.8～2.2mol/L。

注意 2　在本实验室，重复性最好的标记掺入是标记反应在一个温控轨道平台（Lab-Line Instruments）上以 30～50r/min 摇摆时观察到的。

注意 3　标记的孵育温度可以在 25～37℃范围内变动。在 25℃孵育可以延长到 1h，而 37℃孵育 0.5h 以上不会增加标记的程度和已起始转录物的延伸。此外，一些方法推荐细胞核和标记物在 37℃的孵育时间短至 15min（Nevins，1987）。

17.3.6　标记转录物的回收

① 在一个单独的无 RNA 酶的试管中，把 1ml 高盐缓冲液（500mmol/L NaCl；50mmol/L $MgCl_2$；2.5mmol/L $CaCl_2$；10mmol/L Tris，pH 7.4）和 50μl 1mg/ml 的无 RNase 的 DNase Ⅰ在使用前混合。750μl 的混合物加入到每个装有标记好细胞核的试管中。

注意 1　高盐缓冲液使标记反应终止，并且破坏所有余下的完整细胞核。细胞核的破裂大大增加了溶液的黏稠性，因为染色质被释放出来。用硅烷化的❶无 RNase 的巴斯德吸管（微量吸管）或一个安装在 1ml 结核菌素注射器上的 25 号针头来剪切 DNA 几次。

注意 2　DNase Ⅰ的活性要求溶液中含有 $CaCl_2$。

② 37℃孵育此混合物 5min。

注意　用 DNase Ⅰ短暂处理的目的是使基因组 DNA 部分片段化而不是完全降解，这样溶液在物理上会更好操作，而且在以后的纯化步骤中不大会黏着标记好的 RNA 分子。部分降解的 DNA 在接下来的步骤中将被除去。

③ 加入 200μl 十二烷基硫酸钠（SDS）/Tris 缓冲液（5% SDS；500mmol/L Tris，pH 7.4；125mmol/L EDTA）和 15μl 20mg/ml 的蛋白酶 K。42℃孵育 30min 以保证大部分蛋白质被水解。

④ 用 1.25ml 苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提每个样品。800×g 离心 8～10min 以分离液相。

⑤ 将上层水相转移至一个新的试管，然后按顺序加入：2ml 无菌（无核酸酶）的水、3ml 含 10% TCA❷ 的 60mmol/L 焦磷酸钠、15μl 10mg/ml 载体 RNA（如廉价的酵母 RNA）。冰浴 45min。

注意　这些步骤将沉淀标记好的 RNA。

⑥ 用 Millipore Sampling Manifold（Millipore，Billerica，MA），有时也称为真空过滤层，将沉淀过滤到 Whatman GF/A 玻璃纤维滤膜上。每张膜用 10ml 5% TCA、30mmol/L 焦磷酸钠洗涤 2 次。

注意　省略 TCA 沉降步骤和过滤步骤通常会导致难以接受的高背景的出现，在杂交后即使用最严格的洗脱也难以去除这种背景。这是本方法定量的关键步骤。

⑦ 将每张膜转移到一个玻璃闪烁管中，加入 1.5ml DNase Ⅰ缓冲液［20mmol/L HEPES（自由酸），pH 7.5；5mmol/L $MgCl_2$；2.5mmol/L $CaCl_2$］。加入 50μl 1mg/ml 无 RNase 的 DNase Ⅰ，37℃孵育 30min。

⑧ 加入 40μl 500mmol/L EDTA（pH 8.0）和 70μl 20% SDS 以终止消化。

⑨ 加热样品至 60℃并保温 10min，从每张滤纸上洗脱纯化了的 RNA。小心地把上清液

❶ 玻璃器皿的硅烷化参见附录 8。

❷ TCA：三氯乙酸。

转移到一个新的试管中。

⑩ 1.5ml 洗脱缓冲液（1% SDS；10mmol/L Tris，pH 7.5；5mmol/L EDTA）加入装有滤膜的玻璃闪烁管中，重复洗脱步骤。65℃加热 10min，然后小心地回收上清液并与从第⑨步得到的最初的上清液合并。

⑪ 用等体积的苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提所得到的 RNA 一次，接下来用等体积的氯仿抽提一次。

注意 两种情况下，RNA 都会分离到水相（上层）。

⑫ 将水相（约 3ml）转移到一个硅烷化[1]的无 RNase 的 Corex 玻璃管（或等价物）中。加入 650μl 1mol/L NaOH，在冰上孵育不超过 3min。

注意 有限的 RNA 水解往往会提高杂交效率（Jelinek 等，1974）。孵育超过 3min 则有碱水解作用降解 RNA 的风险。然而，有限的水解作用可以降低高分子量 RNA 自杂交的可能性，有益于正向的分子间的杂交动力学。如果需要，这个步骤以及接下来的中和步骤可以一起省略。

⑬ 加入 1.5ml 1mol/L HEPES（自由酸），pH 7.4 以中和反应。

⑭ 加入 0.1 体积 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）（约 500μl）和 2.5 体积冰冷的 95% 乙醇（约 15ml）沉淀 RNA。−20℃保存过夜。

17.3.7 靶 DNA 的制备

① 目的基因的 DNA 序列可以用 PCR 扩增或者从克隆有该序列的质粒中切下的方法制备。在后一种方法中，所用的限制性内切酶只会切载体而不能切 DNA 插入片段。将这些靶 DNA 固定在尼龙膜上就不再赘述；然而，靶 DNA 至少应该有 1.0kb 以保证在硝酸纤维素上的固定量。应该避免使用硝酸纤维素，因为它的结合能力很差。

② 加入 0.1 体积的 1mol/L NaOH 使线性的靶 DNA 变性。室温孵育 30min 或 37℃孵育 10min。

③ 加入 10 倍体积的冰冷的 6×SSC 缓冲液，中和混合物的碱性 pH 值。

④ 做印迹前，将变性的 DNA 一直放置在冰上，但不要超过 15～20min。最好在加入 6×SSC 后 15min 之内完成杂交，以避免已变性样品重新退火。

⑤ 组装 Minifold Ⅰ（斑点印迹）或 Minifold Ⅱ（狭缝印迹）装置（Schleicher & Schuell，Inc.），然后开始使用低真空（第 9 章）。以 100～200μl 的体积吸取 2～5μg（或者其他预先测定的质量）已变性的 DNA 加到每个孔。缓冲液透过膜后，用 300μl 6×SSC 洗涤每个孔。

a. 通常这个量的 DNA 对大多数基因来说是过量的，那些极为丰富的序列如核糖体 RNA（rRNA）和小核 RNA（snRNA）例外。靶 DNA 是否过量可以由以下方法测定。

i. 变化加入 RNA 的量，杂交信号应该和加入 RNA 的量成比例。

ii. 变化在滤膜上的靶 DNA 量，如果 DNA 过量，则对杂交的 RNA 的量应该没有任何影响。

iii. 把没有结合到靶 DNA 或滤膜上的 RNA 再杂交一遍，应该没有这样的杂交出现。

b. 记住硝酸纤维素的 DNA 结合容量仅是 80μg/cm²。特别是当克隆到质粒中的靶 DNA 没有被切下，意味着线性载体和插入片段都要被印迹上，用尼龙膜可能更好。很多尼龙膜的核酸结合能力大于 400μg/cm²。当使用了各种不同大小的载体或各种大小的 DNA 插入片段

[1] 玻璃器皿的硅烷化参见附录 8

克隆到了相同的载体当中这就尤其重要，因为每个孔必须加入同等质量的 DNA 插入片段（而不是载体和插入片段合起来的质量）。这种标准化的方式是必须的，以保证所观察到的杂交信号的变化真实反应不同的转录比率。可以在还没有把样品加到印迹导管孔之前加入适量线性化的非重组载体 DNA（没有插入片段的载体）或者其他载体 DNA 到每一个样品，通过这种方法来实现对靶 DNA 样品质量的标准化。

c. 因为核逃逸实验能够同时检测多种基因的转录程度，一种有价值的印迹策略是在同一印迹管的垂直柱上处理不同目的基因的对应靶 DNA 序列。不要忘记包括一个对应于“看家”功能基因的 DNA，也就是这个基因，它的表达水平在规定的实验条件下不应该变化。因此，滤膜可以切成窄条，并且在最小体积的杂交缓冲液中与极为混杂的 RNA 探针杂交。

d. 在组装斑点印迹装置之前记住要在无核酸酶的水中 5min 然后再在 6×SSC 中至少几秒预湿滤膜。

e. 与斑点印迹装置（12.5mm^2）相比，狭缝印迹装置会使样品集中于更小的区域（6mm^2）。因此，狭缝印迹所得到的数据比斑点印迹更容易量化，因为狭缝的形状使图像分析软件更易量化。

f. 记住在每张用来杂交的滤膜条中都包括一个合适的阴性对照（如一个非重组载体）和阳性对照（如果可能的话）。

g. 为了显示这个方法的线性关系，建议至少做三个滤膜条，在这些滤膜上已经固定了靶 DNA 样品。然后基于测定到的比放射性（cpm），把由核逃逸所产生的异质的标记 RNA 做多轮两倍稀释。然后用这些稀释产物与单独的载有目的 DNA 的滤膜杂交。杂交检测所得到的信号强度，应该反映出经过两倍稀释后的标记了的 RNA 的量。

⑥ 按照生产商的说明书，将靶 DNA 固定在滤膜上以备下一步杂交之用。通常用一个校准了的紫外（UV）光源将 DNA 交联到尼龙膜上。而硝酸纤维素是在真空中 80℃烘烤 2h 固定核酸。尼龙膜也可以用烘烤的方法代替，在低到 65℃的温度烘烤不到 1h（不需要在真空中）。滤膜可以立即使用或储存在一个低温干燥的地方待用。将核酸固定到固体支持物上的详细论述见第 12 章。

17.3.8　用于杂交的 RNA 的制备

① 4℃、10000×g 离心 30min 回收沉淀的 RNA。小心地将尽可能多的乙醇倒入放射性废物缸。短暂晾干后用 70%乙醇（用 DEPC 处理过的水稀释 95%的乙醇）洗涤一次。离心（如果需要），然后把用于洗涤的乙醇尽可能倒掉。允许短暂晾干试管。

② 用 1ml TES[1] 溶液（10mmol/L TES，pH 7.4；10mmol/L EDTA；0.2% SDS）重悬 RNA 团块。室温下在一个轨道平台上以 100r/min 的速度振荡样品以重新溶解 RNA。

③ 从每个样品中取 5μl 进行 1min 计数以检测 cpm/ml。以 cpm/ml 为准通过加入 TES 溶液将样品均一化，为每个杂交提供几乎相等的计数。通常，cpm/ml 值平均为每 5×10^7 核中约 10^7 cpm/ml。

注意　用 cpm 标准化样品是基于这样的假设，RNA 合成的总体水平作为细胞状态的一个函数没有改变，只是特定的基因上调或下调了。研究者必须凭经验来衡量这个假设对每一组新的细胞状态条件是否合理。并且保证实验起始于相同数量的细胞核。

[1] TES：*N*-tris（羟甲基）甲基-2-氨基乙烷硫酸。

④ 把载有固相化靶 DNA 序列的滤膜切成条。使每一条滤膜都载有一组将要与标记 RNA 探针杂交的靶 DNA。

⑤ 杂交直接在干净的 5ml 闪烁管中进行时，其效率和重复性最高。可按如下操作进行：把载有 DNA 的滤膜条卷起来，小心地推到一个闪烁管的底部，使滤膜固定 DNA 的一面朝向管子的中心。

注意 1 这种杂交方式可以使所需探针量最小化，并保持最大的探针浓度。而且，这种方法会使在塑料袋中杂交必然造成的放射性污染最少化。

注意 2 为了保证闪烁管是无 RNase 的，强烈建议那些管子用 H_2O_2 浸泡至少 20min，然后用灭菌水彻底冲洗。

⑥ 用 1ml TES/NaCl（10mmol/L TES，pH 7.4；10mmol/L EDTA；0.2% SDS；600mmol/L NaCl）与 1ml RNA 溶液混合。把得到的 2ml RNA 探针溶液加到装有靶 DNA 滤膜条的闪烁管中，盖紧管盖，然后在 65℃杂交 24～36h。确保管中的滤膜完全浸没在杂交液中。

注意 在本实验室，最高效的杂交方法是将单个的闪烁管插入到一次性聚苯乙烯架上，这种架子经常用于装载 15ml 离心管。然后把架子放到 65℃预热的轨道摇床孵育器的平台上，在整个杂交过程中都缓慢摇动（50～70r/min）。

17.3.9 杂交后的洗脱和检测

⑦ 杂交结束时，用预热到 65℃的 2×SSC 以过量体积批量洗涤滤膜 1h。

⑧ 将滤膜放入装有 8ml 2×SSC 和 12μl 10mg/ml RNase A 的单独玻璃闪烁管中。另外，也可以用含有 RNase A（0.5μg/ml）与 RNase T_1（5U/ml）的 2×SSC 消化非特异的 RNA 分子。37℃孵育 30min，不需要摇动。

注意 典型的 RNase A 储存液是 2mg/ml，RNase T_1 是 5000U/ml。

⑨ 在 37℃以过量体积的 2×SSC 批量洗涤滤膜 1h。短暂沥干滤膜，保证它们没有完全干燥。将湿的滤膜放置在塑料包装膜上，然后固定于固体支持物如 Whatman 3mm 纸或一片硬纸板上。然后进行放射自显影（见第 15 章）。

注意 使用图像分析软件很容易量化自显影胶片上的信号强度，但首先要确保所观察到的信号是在胶片的线性范围之内，这可以很容易地通过变换曝光时间来曝光几张胶片而做到。

⑩ 放射自显影后，可以从结合在膜上的 DNA 上把杂交的 RNA 探针洗脱下来，用 0.4mol/L NaOH 42℃洗膜 30min，接着用 1×SSC、0.5% SDS 65℃洗脱 60min。这种方法可以去除所有杂交上的 RNA，使得下一轮杂交效率不会受到影响。

⑪ 如果滤膜不再用于下一轮杂交，可以从滤膜条切下合适的样品，然后直接在闪烁液中计数，精确定量所观察到的放射自显影信号。

17.4 实验方案：核逃逸实验（备选方法）

传统的核逃逸实验操作麻烦而且耗费人力，已有一种简化的版本（Celano 等，1989b），本文提供一个该简化版的修订本。在这个方法中，标记了的 RNA 转录物用酸-苯酚-硫氰酸胍抽提（Chomczynski 和 Sacchi，1987；见第 5 章）纯化。这项技术的主要优点是标记后的

RNA 可以立即迅速地被纯化出来，使用胍缓冲液而不用 TCA 沉降的好处有很多。在整个操作过程中要保证始终戴着手套并且遵守良好的无 RNase 的技术规范。

① 按前述方法或其他方法（deBustros 等，1986；Celano 等，1989a）分离细胞核。

② 把分离得到的细胞核（最多 5×10^7）用 160μl 核储存缓冲液（40%甘油；50mmol/L Tris，pH 8.3；5mmol/L $MgCl_2$；0.1mmol/L EDTA）收集到无菌的 2.2ml 微量离心管中。然后在乙醇-干冰浴中冷冻细胞核后－80℃储存，可保存 1 年。不要将这种类型的管子储存于液氮中。作为可选方案，整份细胞核可以储存在细胞冻存安瓿中，密封，储存于液氮中可保存 1 年。

③ 在冰上融化冻着的整份细胞核。每 200μl 细胞核中加入 25μl 10×溢出缓冲液（40mmol/L ATP、GTP、CTP；5mmol/L DTT；50mmol/L $MgCl_2$；800mmol/L KCl）和 20μl [α-^{32}P] UTP（200μCi；3000Ci/mmol），26℃孵育 15min。

④ 裂解细胞核后，加入 12μl 20mmol/L $CaCl_2$ 和 12μl 10mg/ml 无 RNase 的 DNase Ⅰ消化 DNA。26℃孵育 5min。

⑤ 加入 30μl 10×SET（5% SDS；50mmol/L EDTA；10mmol/L Tris，pH 7.4）和 7μl 10 mg/ml 载体 RNA（如廉价的酵母 RNA）。加入 3μl 10mg/ml 蛋白酶 K 对肽进行水解。37℃孵育样品 30min。

⑥ 用一个安装在 1ml 结核菌素注射器上的 25 号针头小心地重复吸取裂解液以剪切基因组 DNA。

⑦ 将下述溶液加到装有标记好的核 RNA 的每一个管中（加入后混匀），从样品中抽提 RNA。

500μl GTC（4mol/L 硫氰酸胍；25mmol/L 柠檬酸钠，pH 7.0；0.5% *N*-十二烷基肌氨酸钠；0.1mol/L 2-巯基乙醇）

80μl 乙酸钠（2mol/L，pH 4.8）

800μl 水饱和苯酚

160μl 氯仿：异戊醇（49：1）

在冰上孵育样品至少 15min。

注意　如果需要，用于 RNA 分离的商品化试剂（如 TRI 试剂）可以替代这一步。按照产品说明书直接从这一步高效分离 RNA。

⑧ 12000×*g* 微量离心 10min，如果可能在 4℃离心。

⑨ 将上层水相转移到一个新的微量离心管中，小心避免取到界面上的沉淀。加入等体积的异丙醇到水相以沉淀 RNA。将样品在－80℃保存至少 1h 或－20℃过夜。

⑩ 12000×*g* 微量离心 10min，以收集沉淀的 RNA。如果可能在 4℃离心。

注意　推荐用 300μl 硫氰酸胍溶液（见第⑦步）重新溶解 RNA 团块并且转移到一个 1.7ml 微量离心管中。如前所述，加入 300μl 异丙醇后，离心收集沉淀。

⑪ 用 70%乙醇（用 DEPC 处理过的水稀释 95%的乙醇）洗涤沉淀 2～3 次，然后在空气中短暂晾干。如果需要，最后一次用 95%的乙醇洗涤将会加速晾干过程。不管在哪种情况下，都不要让 RNA 完全干燥。将 RNA 沉淀溶解在 250～500μl 10mmol/L Tris（pH 7.2）、1mmol/L EDTA、0.1% SDS 溶液中。

⑫ 取 2μl 用来计数检测 RNA 探针的放射活性。当用 5×10^7 个细胞起始时，总的预期活性大约是 1×10^7 cpm。

⑬ 按前述方法或其他方法（deBustros 等，1986；Celano 等，1989a），用标记好的 RNA 与靶 DNA 序列进行杂交。

17.5 实验方案：核酸酶保护和脉冲标记转录法

核逃逸实验的原理是在分离的细胞核中将标记掺入到新生的转录物中。脉冲标记方法则明显不同，它是用［^{3}H］-尿嘧啶脉冲标记细胞 5min（Nevins 和 Darnell，1978）。它要求足够高的转录效率，以获得有意义的标记掺入。这显然不适用于单拷贝基因或其他以相对较低的转录效率进行转录的基因。已经可以用核酸酶保护法和细胞核 RNA 的脉冲标记联用的方法来部分克服上述问题以及其他在制备可产生有意义标记掺入的细胞核时存在的内在困难（Greene 和 Pearson，1994）。

这项技术涉及脉冲标记培养的细胞 10min，接着分离 RNA，用冷的（即没有标记的）基因特异性序列在溶液中杂交，最后用 S1 核酸酶孵育。用这种方法，特异基因的 cDNA 探针能产生比寡核苷酸探针可信度明显要高的数据。沉淀抗核酸酶降解的杂交物，由掺入的标记推断相对转录比率，用 Cerenkov 计数检测。与大多数转录检测方法相比，本方案获得的资料具有下述优点，在转录物标记过程中维持了天然细胞核的构型，以及标记过程中保持细胞的构型。标记过程结束时，从细胞中分离出可用于杂交分析的 RNA。简而言之，这是一种快速、高定量方法。而且，由于不需要用 X 射线胶片，使用闪烁计数的方法，克服了放射自显影的内在缺陷（长曝光时间，胶片的非线性）。因此，这种方法能够检测转录活性的微妙变化，这些微妙变化可能在更传统的核逃逸实验中是检测不到的。

① 用直接加入生长介质组织培养管的方法，加入 25μCi/ml［^{3}H］-尿嘧啶（比活性 27.1Ci/mmol），标记生长在组织培养液中的细胞。

注意 包括所有对照，需要 10^7 个细胞的 RNA（见步骤⑪）。

当心 在标记阶段结束时，一定要根据部门的指导，安全地处理放射性组织培养基和 RNA 分离副产物。

② 收集细胞，用冰冷的 PBS 洗涤细胞沉淀物。所有的后续离心都在 4℃进行。

③ 在 1.8ml NP-40 裂解缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.4；10mmol/L NaCl；3mmol/L $MgCl_2$；0.5%NP-40）中重悬细胞（多至 10^7）。将细胞转移到高压灭菌的 2.2ml 微量离心管中。冰上孵育 3min。

④ 4℃ 4000×g 离心 5min 收集细胞核。

⑤ 小心地除去并弃掉上清液。在 800μl SDS 缓冲液（0.5% SDS；1mmol/L $CaCl_2$；5mmol/L $MgCl_2$；20mmol/L HEPES，pH7.5）中重悬细胞核。

⑥ 加入 50U 不含 RNA 酶的 DNase Ⅰ，37℃孵育 15min。

⑦ 将细胞核裂解物分到 2 个微量离心管中，然后小心地用等体积的酚：氯仿：异戊醇（25∶24∶1）提取各管。

⑧ 离心分离各相。小心地将上层水相转移到新离心管中。

⑨ 加入 0.1 体积的 3mol/L 乙酸钠（pH5.2）和 2.5 体积的 95% 乙醇沉淀 RNA。−20℃保存几小时至过夜。

⑩ 小心地用 70% 乙醇（用无菌水稀释 95% 乙醇）洗涤样品一次，如果需要，再离心一次。短时间风干样品，但不使其完全干燥。

⑪ 在 125μl S1 杂交缓冲液（40% 去离子甲酰胺；40mmol/L PIPES，pH6.4；400mmol/L NaCl；1mmol/L EDTA，pH8.0）中重悬 RNA 沉淀物。重复吹吸以确保 RNA 重新溶解。这是一个很重要的步骤。不要剧烈振荡。

注意 1　将 RNA 沉淀物溶解在足够的杂交缓冲液中，使各杂交反应达到 20μl。

注意 2　各样品均为一式两份，不要忘记对照反应。合适的对照包括：①没有探针和没有 S1 核酸酶的管；②没有探针，有 250U S1 核酸酶的管；③有探针但没有 S1 核酸酶的管。

⑫ 加热各重悬的 RNA 样品至 50℃，2min。

⑬ 向样品中加入冷的变性探针（未标记）至终浓度为 25ng/μl 或 0.5μg 探针/20μl 杂交反应液。

注意　一定要用线性化的变性的 DNA。可将双链探针煮沸 10min 使其变性，然后置于冰中，直到使用。或者可将 RNA-探针混合物加热到 65℃，10min，以保证在杂交起始时所有的反应物都是变性的。

⑭ 在实验确定好的温度下杂交过夜。参见第 14 章中关于优化的建议。如果不确定起始温度，就在 37℃杂交。

⑮ 在杂交阶段结束时，向各样品中加入：

160μl 2×S1 核酸酶缓冲液（0.5mol/L NaCl；0.1mol/L 乙酸钠，pH5.5；9mmol/L $ZnSO_4$）

142μl 水

6μl 煮沸过的鲑精 DNA（10mg/ml；[最终]≈0.02μg/ml）

12μl S1 核酸酶（25U/μl；[最终]≈1U/μl）

32℃孵育 1h。

注意　一定要准备一个未加入任何 S1 核酸酶的对照。这将提供该系统的总计数。

⑯ 向各样品中加入 80μl 终止缓冲液（3mol/L 乙酸钠，pH5.2；20mmol/L EDTA，pH8.0；40μg/ml 载体 RNA）。

⑰ 各管中加入 1.0ml 冰冷的 95%乙醇。上下颠倒以彻底混合，然后冰上孵育 20min。

⑱ 用 Millipore Sampling Manifold（有时也称为真空过滤层；Millipore，Billerica，MA）在 GF/F 玻璃纤维滤膜上收集沉淀物。

⑲ 用 500μl 冷的 70%乙醇洗涤各滤纸两次。

⑳ 将滤膜转移到闪烁管中，加入合适体积的闪烁液。对样品进行液闪计数，计数 5min，重复 3 次。各滤膜上保留的活性直接与探针和靶 RNA 的杂交程度成比例，因此与相对合成速率成比例。

17.6　RNA 聚合酶Ⅰ、RNA 聚合酶Ⅱ和 RNA 聚合酶Ⅲ活性的区分

可用核逃逸实验同时评价几个基因组序列的相对转录活性。在真核细胞中，转录产物是三种 RNA 聚合酶共同作用的结果。用来自一种毒性很强的蘑菇（*Amanita phalloides*）的真菌环化八肽（α-鹅膏蕈碱）可区分这些酶的活性。这种毒素结合于 RNA 聚合酶，并且这三种真核 RNA 聚合酶对该毒素的敏感性不同（Roeder，1976）。如浓度为 0.01μg/ml 时，RNA 聚合酶Ⅱ的活性降低 50%（Roeder，1976）。RNA 聚合酶Ⅲ也对 α-鹅膏蕈碱的抑制活性敏感，但要达到同样 50%的抑制活性需要 25μg/ml 的浓度。相反，RNA 聚合酶Ⅰ对 α-鹅

膏蕈碱不敏感。虽然 α-鹅膏蕈碱毒性极强，操作时必须十分小心，但它是测定各种聚合酶的 RNA 合成量的一种很有用的工具。在一种或多种标记反应中加入 α-鹅膏蕈碱是一个重要并且非常好的阴性对照，它证明印迹杂交是可信的而不是人为的假象。在用斑点印迹进行定量杂交时，这种阴性对照尤其有用。

从培养细胞中分离出的细胞核中，RNA 聚合酶Ⅰ、RNA 聚合酶Ⅱ、RNA 聚合酶Ⅲ对观察到的总 RNA 合成的贡献，分别约为 50%～70%、20%～40%和约 10%。对任意模型系统进行三个独立的标记反应，在加入细胞核之前，α-鹅膏蕈碱以反应缓冲液组分加入，这样就可对三种 RNA 聚合酶的贡献进行更清楚的测定。

① 标记反应中未加入 α-鹅膏蕈碱。

② 标记反应中加入 1μg/ml α-鹅膏蕈碱。

③ 标记反应中加入 100μg/ml α-鹅膏蕈碱。

加入细胞核后，将反应混合物在冰上短暂孵育，然后转到进行标记反应的温度。

反应①和②转录产物总量的差值代表 RNA 聚合酶Ⅱ的活性。反应②和③转录产物总量的差值代表 RNA 聚合酶Ⅲ的活性。反应③的活性是来自 RNA 聚合酶Ⅰ的活性。这些由 α-鹅膏蕈碱毒性引起的差异，可用斑点印迹分析（第 9 章）、在变性琼脂糖凝胶上分离转录产物、或用 10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳；通过使凝胶放射自显影，可看到所有转录产物的大小分布。

此外，还可用蔗糖密度梯度离心来测定转录物的大小分布（Marzluff 和 Huang，1984）。这种方法比简单的凝胶电泳更费时间，并且需要专门的设备。操作如下。

① 将 RNA 样品溶解在含 1mmol/L EDTA、pH7.5 的 0.1% SDS 溶液中；将 0.5ml 此溶液加入 17ml 10%～40%（100～400g/L）蔗糖梯度中，该蔗糖梯度由 0.1mol/L NaCl、1mmol/L EDTA、0.1%SDS 和 10mmol/L Tris 配制，pH7.5。该梯度必须在适于超离心的管中制备。

② 在合适的转子中以 90000×g 转速离心 16h。用此处限定的参数能够检测出 4S～45S 的所有 RNA，28S RNA 沉降在梯度的下 60%处。

③ 然后，用 254nm 处的紫外吸收将这些梯度分级（例如用 ISCO UA-6 监测器/分级收集器），取 10μl 各组分检测 TCA 可沉淀计数来测定各组分中的放射活性。

17.7 提取用于稳态分析的核 RNA

核逃逸实验是在标记的 NTP 前体存在下，测定新延伸合成出的多聚核糖核苷酸，因而可用于测定各基因的转录速率。此外，用 Northern 分析研究核 RNA 对于理解初级转录物的加工是非常重要的。在这两种类型的试验中，从杂交信号强度可得出定量数据。很多方法可用来检测杂交信号。为了评价标记核转录物的总体大小分布，可取一份反应混合物通过伴有凝胶内放射自显影的小凝胶电泳来研究。

或者可将靶 DNA 消化、电泳、在滤膜上 Southern 印迹，然后与异源的标记核 RNA 群体杂交。然而该技术的一个重要缺陷是缺少核 RNA 分子自身的信息，因为电泳的是 DNA 片段而非 RNA 片段。在极端的情况下，全长 hnRNA 分子的大量降解可导致产生的寡核糖核苷酸与靶 DNA 分子非特异性杂交，而全长的未降解的 hnRNA 不能与靶 DNA 分子正常杂交。高严谨度的洗涤，并结合 RNase 消化非特异性 RNA 分子，可降低由上述现象导致的背景。

基因表达研究中，RNA 的代谢周转是个重要的指标，特别是试图在转录后水平阐明基因表达调控时，核 RNA 的 Northern 分析是该研究中必需的部分。成功的核 RNA Northern 分析基于分离条带的信号强度，可获得定量数据，并且还能提供单独用斑点印迹不能得到的定性分析结果。出现可重现的条带模式，则强烈证实初级 RNA 转录物的存在，这样做证明了核逃逸实验的可靠性。放射自显影图上的一系列条带是与编码（与外显子相关）序列的剪接和伴随的非编码（与内含子相关）序列的去除相关的。

Northern 杂交分析中核 RNA 的分离，开始于如前所述从全细胞或组织样品中制备细胞核。质量最高的 RNA 总是来自最有利的提取方法，即缩短从细胞破碎到 RNA 在滤膜上固定的时间间隔。可使用基于胍盐的技术抑制细胞中 RNase 活性（Chirgwin 等，1979；Chomczynski 和 Sacchi，1987）。一旦将细胞核从细胞质中分离出来，就可选用从完整细胞中分离 RNA 的方法，从细胞核中纯化 RNA。在核 RNA 分离过程中也必须控制核酸酶，用有机溶剂抽提可得到令人满意的结果。很多分离核 RNA 的实验方案都推荐在酚存在的情况下加热样品，同时剧烈振荡以剪切基因组物质。

17.8　实验方案：直接分离核 RNA

下述方法是改进了的 Soeiro 和 Darnell（1969）法，其中，用热酚提取 RNA 保持不变。

① 冰上融解冰冻的细胞核，4℃、750×g 离心 3min。如果以新鲜制备的细胞核为起始材料，则进行步骤②。

② 用 1ml 冰冷的改进的 RSB/K 缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.9；10mmol/L NaCl；10mmol/L $MgCl_2$；100mmol/L KCl）洗涤细胞核沉淀。转移细胞核到不含 RNase 的聚乙烯管中。

注意　如果按比例缩小提取液的体积，可在 2.2ml 的微量离心管中分离 RNA。一般最好使核酸保持在浓缩状态，在尽可能小的体积下进行操作。

③ 用高盐缓冲液（HSB）（10mmol/L Tris，pH 7.4；500mmol/L NaCl；50mmol/L $MgCl_2$；2mmol/L $CaCl_2$）重悬细胞核沉淀物，浓度为（1～5）×10^7 个细胞核/ml，高盐缓冲液中加入了不含 RNase 的 DNase Ⅰ至终浓度为 50 U/ml。

注意　HSB 可提前配制，但是无 RNase 的 DNase Ⅰ必须在使用前才加入。

④ 室温，上下吹吸该混合物 30s。这对于裂解液的均一性是必需的。

注意　用 DNase Ⅰ短暂处理的目的是部分断裂而不是完全降解基因组 DNA。黏性的降低使得操作更容易。该方法的后续步骤中将选择性去除 DNA。

⑤ 加入等体积的 SDS 提取缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.4；20mmol/L EDTA；1% SDS）。

⑥ 加入等体积的 NETS 缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.4；100mmol/L NaCl；10mmol/L EDTA；0.2% SDS）饱和的酚。

注意　酚饱和的注意事项参见附录 3。

⑦ 加入等体积的氯仿或氯仿：异戊醇（49∶1）的混合物。小心地彻底混合。

⑧ 加热到 55℃，10min，间歇摇动。

⑨ 冰上或冰水浴冷却 5min。2500×g 离心 3min 以分离各相。

⑩ 小心地沿管侧滑动硅烷化的无菌巴斯德移液管或微量离心机（微量移液器）的枪头，通过液相和中间层，从管的底层将有机相吸上来并弃去。使液相和中间相保留在管中，重复步骤⑥和步骤⑦。

注意 1 当制备少量的核 RNA 时，有可能因染色质吸附而损失 RNA，此时该方法尤其重要。

注意 2 关于玻璃器皿硅烷化的说明参见附录 8。

⑪ 2500×g 离心 3min 分离各相。

⑫ 小心地回收水相，注意不要干扰下层有机相以及中间层（如果存在的话）。在水相中加入等体积的氯仿，小心地彻底混合。短暂离心分离各相。

⑬ 将水相转移到新管。加入 2.5 体积冰冷的 95%乙醇置于－20℃沉淀核 RNA。

⑭ 4℃离心收集沉淀物。用 70%乙醇（用无菌水稀释 95%的乙醇）至少洗涤一次以除去过量的盐。如第 8 章所述测定产量并进行质量控制检测。

17.9 实验方案：从富含核糖核酸酶的细胞中制备核 RNA

下述方法是改进了的 Chomczynski 和 Sacchi（1987）法。这是基于 RNA 分离产品 TRI 试剂和 TRIzol 的方法。不想自己制备试剂的，可放心地用下述实验方案取代上述两种产品。

① 如前所述制备细胞核，可提前制备细胞核并冷冻储存。冷冻的细胞核需在冰上解冻 3～5min。

② 加入 GTC 溶液 D（4mol/L 硫氰酸胍；25mmol/L 柠檬酸钠，pH7.0；0.5% N-十二烷基肌氨酸钠；100mmol/L 2-巯基乙醇）裂解完整的细胞核。每 2×10^6 个细胞核使用 100μl 溶液。

注意 该方法以下步骤中所示的体积是假设溶液 D 的起始体积为 1ml。对于按比例放大的提取液体积，需要适当增加所有其他溶剂的体积。如果所用溶液 D 少于 800μl，所有的提取均可在 2.2ml 的离心管中进行。

③ 将组织匀浆，转移到一次性聚乙烯管中（15ml 管效果最好），按顺序加入：

0.1ml 2mol/L 乙酸钠，pH5.2

1.0ml 水饱和酚（分子生物学级别）

0.2ml 氯仿：异戊醇（49：1）

加入试剂后，盖上管盖，小心地颠倒，彻底混合。所有试剂都加入后，剧烈振荡管子 10s。

④ 冰上使样品至少冷却 15min，然后 4℃离心分离各相。

注意 Corning 聚乙烯管可承受的最大重力加速度是 6000×g。使用前一定要检查制造商的离心力速率说明。

⑤ 将水相（含有 RNA）转移到新管中，与 0.75 体积（约 1ml）异丙醇混合。－20℃保存至少 1h 以沉淀 RNA。

注意 沉淀 RNA 的管子应该可承受下一步所需的 10000×g 离心。如果体积太大不能装到 1 个或几个微量离心管中，则改用用酸洗涤过的 Corex 玻璃管和合适的橡皮垫。

⑥ 4℃、10000×g 离心 20min 收集沉淀。小心地倒出并弃掉上清液。

注意 关于该步骤中离心管的选择参见步骤⑤。

⑦ 将 RNA 沉淀物完全溶解在 300μl 溶液 D（见步骤②）中，然后转移到不含 RNA 酶的 1.5ml 微量离心管中。

⑧ 加入 0.75 体积的冰冷的异丙醇，－20℃下放置 1h 以重新沉淀 RNA。

⑨ 在微量离心管中于 4℃以最高速离心 10min 收集沉淀。小心地倒出并弃掉上清液。

⑩ 用 70%乙醇洗涤沉淀，再次离心。可再用 95%乙醇洗涤沉淀一次以加速其在空气中的干燥。不要使样品完全干燥。

⑪ 将潮湿的 RNA 沉淀重新溶于 50μl TE 缓冲液（pH7.5）或 50μl 无菌水中。65℃孵育 10min 有助于溶解。测定样品浓度（第 8 章）；RNA 分装并存储于－80℃，避免反复冻融。

17.10 参考文献

Benecke, B. J., Ben-Ze'ev, A., and Penman, S. (1978). The control of mRNA production, translation, and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* **14,** 931.

Ben-Ze'ev, A., Farmer, S. R., and Penman, S. (1980). Protein synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* **21,** 365.

Celano, P., Baylin, S. B., and Casero, R. A. (1989a). Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264,** 8922.

Celano, P., Berchtold, C., and Casero, R. A. (1989b). A simplification of the nuclear runoff assay. *BioTechniques* **7,** 942.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18,** 5294.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162,** 156.

deBustros, A., Baylin, S. B., Levin, M. A., and Nelkin, B. D. (1986). Cyclic AMP and phorbol esters separately induced growth inhibition, calcitonin secretion, and calcitonin gene transcription in cultured human medullary thyroid carcinoma. *J. Biol. Chem.* **261,** 8036.

Derman, E., Krauter, K., Walling, L., Weinberger, C., Ray, M., and Darnell, J. E. (1981). Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell* **23,** 731.

Ernest, M. J., Schultz, G., and Feigelsen, P. (1976). RNA synthesis in isolated hen oviduct nuclei. *Biochemistry* **15,** 824.

Farrell, R. E., Jr., and Greene, J. J. (1992). Regulation of *c-myc* and *c-Ha-ras* oncogene expression by cell shape. *J. Cell. Physiol.* **153,** 429.

Greenberg, M. E. (1988). Identification of newly transcribed RNA. *In* "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Eds.), p. 4.10.1. John Wiley & Sons, New York.

Greene, J. J., and Pearson, S. L. (1994). Measurement of gene-specific transcription by nuclease protection of pulse-labeled nuclear RNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* **29,** 179.

Groudine, M., Peretz, M., and Weintraub, H. (1981). Transcriptional regulation of hemoglobin switching on chicken embryos. *Mol. Cell. Biol.* **1,** 281.

Gurney, T., and Foster, D. N. (1977). Nonaqueous isolation of nuclei from cultured cells. *Methods Cell Biol.* **16,** 45.

Jelinek, W., Molloy, G., Fernandez-Munoz, R., Salditt, M., and Darnell, J. E. (1974). Secondary Structure in heterogenous nuclear RNA: Involvement of regions from repeated DNA sites. *Mol. Biol.* **82,** 361.

Kanazawa, A., O'Dell, M., Hellens, R. P., Hitchin, E., and Metzlaff, M. (2000). Mini-scale method for nuclear run-on transcription in plants. *Plant Mol. Biol. Reporter* **18,** 377.

Krämer, A., Frick, M., and Keller, W. (1987). Separation of multiple components of HeLa cell nuclear extracts required for pre-messenger RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **262,** 17630.

Lund, E., and Paine, P. L. (1990). Nonaqueous isolation of transcriptionally active nuclei from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* **181,** 36.

Manley, J. L. (1984). Transcription of eukaryotic genes in a whole-cell extract. *In* "Transcription and Translation: A Practical Approach." (B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds.), p. 71. IRL Press, Oxford, England.

Marzluff, W. F. (1978). Transcription of RNA in isolated nuclei. *Methods Cell Biol.* **19,** 317.

Marzluff, W. F., and Huang, R. C. C. (1975). Chromatin directed transcription of 5S and tRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72,** 1082.

Marzluff, W. F., and Huang, R. C. C. (1984). Transcription of RNA in isolated nuclei. *In* "Transcription and Translation: A Practical Approach" (B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds.), p. 89. IRL Press, Oxford, England.

Marzluff, W. F., Murphy, E. C., and Huang, R. C. C. (1973). Transcription of ribonucleic acid in isolated mouse myeloma nuclei. *Biochemistry* **12,** 3440.

Marzluff, W. F., Murphy, E. C., and Huang, R. C. C. (1974). Transcription of the genes for 5S ribosomal RNA and transfer RNA in isolated mouse myeloma cell nuclei. *Biochemistry* **13,** 3689.

Nevins, J. R. (1987). Isolation and analysis of nuclear RNA. *Methods Enzymol.* **152,** 234.

Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: Poly(A)$^+$ nuclear sequences are conserved and poly(A)$^+$ addition precedes splicing. *Cell* **15,** 1477.

Price, R., and Penman, S. (1972). A distinct RNA polymerase activity, synthesizing 5.5S, 5S, and 4S RNA in nuclei from adenovirus 2-infected HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **70,** 435.

Roeder, R. G. (1976). Nuclear RNA polymerase. *In* "RNA Polymerase" (R. Losick and M. Chamberlain, Eds.), pp. 283–329. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Soeiro, R., and Darnell, J. E. (1969). Competition hybridization by "pre-saturation" of HeLa cell DNA. *J. Mol. Biol.* **44,** 551.

Wittelsberger, S. C., Kleene, K., and Penman, S. (1981). Progressive loss of shape-responsive metabolic controls in cells with increasingly transformed phenotype. *Cell* **24,** 85.

（李洋译；史毅校）

第 18 章　cDNA 合成

18.1　基本原理

RNA 是细胞中易于得到的一类分子。前几章里已经阐述了很多裂解各种来源生物体的组织及细胞的有效方法。这些是提纯 RNA 首要的并且必要的步骤。如果对后面的操作给以足够的小心，所提取的 RNA 应该能满足一般用于研究基因在转录水平上的实验。也因此，基因表达的研究需要 RNA 水平上的分析数据。

经典的 Northern 杂交、核酸酶保护实验、新生 mRNA 分析技术（核逃逸实验）都是用互补的 RNA 或 DNA 探针来分析目的 RNA 的丰度。然而必须强调的是，这些检测方法都存在一个灵敏度问题，这一问题主要是 RNA 自身的两个特性导致的：①不稳定性；②单个 RNA 分子不能被直接扩增来增强信号。因此，为方便分析，RNA 通常先反转录为互补 DNA(cDNA)。而扩增 DNA 的技术目前已经很成熟，人们经常以天文倍数扩增基因组和 cDNA。此外，一个主要的便利之处在于 cDNA 比它的模板 RNA 要稳定得多。这样可以运用一系列技术大规模地对基因进行短期或长期的分析。因此，合成 cDNA 的最大用处，在于它能够对细胞内基因转录活跃位点的产物（即 RNA 分子）作永久性的保存。

18.2　cDNA 合成概述

cDNA 合成是分子生物学最基本、最核心、同时也是具有挑战性的化学合成技术。这类合成并非是结构性的，因为从序列组成上来说，cDNA 和基因组是一样的，有可用的单链和双链两种形式。尽管经典的 cDNA 扩增方法已经让位于 PCR（聚合酶链反应），但掌握传统的 cDNA 合成机理对于正确理解生物学技术以及分析实验数据都是很有帮助的。下面就对奠定了当代生物学基础的 cDNA 合成技术作一个总结性的回顾。

cDNA 是以 RNA 为模板，在酶催化作用下体外合成的产物。在开始的一段时间内它是条单链。高质量的 RNA 是合成 cDNA 的必要条件。一般来说，一些常规的 RNA 分析只需要几微克量的 RNA，一些新的技术所需要的 RNA 起始量甚至可以更少。最初，人们总是选择含有 poly(A)$^+$ 的 RNA 作为合成 cDNA 的模板；现在实验室比较常见的是直接抽提总 RNA 或细胞质 RNA 作为模板，而不再纯化含有 poly(A)$^+$ 的 RNA。由于 PCR 技术的成熟运用，以 poly(A)$^+$ RNA 作为模板合成 cDNA 是没有必要且不值得推荐的了，因为这种方法在操作过程中会损失低丰度的转录本，达不到分析的要求。不过，在某些特殊的实验中，

以 poly(A)$^+$ RNA 作为模板合成 cDNA 也是可以的。

对于研究者来说，合成 cDNA 在研究基因表达和结构、开发核酸探针以及表达体内难以纯化的蛋白质等方面存在很多的优势。第一，RNA 是单链，并且自然状态下是很不稳定的分子。而转化为稳定的双链 cDNA 后，序列信息就可以长期保存。第二，现代分子生物学已开发出大量可供选择的载体和对应的宿主。合成并克隆目的 cDNA 使得进一步亚克隆等操作变得得心应手。简单地说，若在某一样品中回收扩增的大量 cDNA，并使之连接进入合适的载体，然后转化到对应的细菌或连接到病毒载体序列，便构建了 cDNA 文库。cDNA 文库就是对某一细胞样品在某个时刻基因表达情况的记录档案。第三，长短不一的cDNA分子可以通过杂交方法来筛选比较复杂的基因组 DNA 库，如确定外显子、内含子、编码基因以及 5′非编码区域和 3′非编码区域。第四，如上所述，cDNA 文库可以长期保存某一时刻细胞内基因的表达情况，只有那些在这一时刻存在转录活性并产生 mRNA 转录本的基因位点才有 cDNA 合成。相比 cDNA 文库而言，从基因组中克隆出的 DNA 序列则无任何关于基因表达转录状态的信息。

cDNA 直接由 RNA 作为模板经过反转录而来。因此，合成后的 cDNA 就直接反映了合成前细胞内的 RNA 状况。特定生物体内所有有核细胞都有相同的遗传物质。比如说，若对同一动物肝组织和脾组织的基因组 DNA 进行分析，会得到几乎相同的数据结果。而由于各种基因表达水平以及相互作用的差异性，这两种细胞在表型和生理特性上才呈现出明显的不同。尽管由于一些用于维持自身生存基因的表达，不同类型的组织或两个细胞之间的 cDNA 文库有相同的部分，但就某一生物体来说，它的某个时期特定样品中 cDNA 文库的组成是独一无二的。而且，必须意识到，一个细胞的 RNA 组成会随着实验环境的变化，甚至细胞周期的变化而发生变化。这样特定的样品不同时间所构建的 cDNA 文库也会有所差异。综上所述，从特定生物体不同组织来源的细胞构建的 cDNA 文库之间有很大的不同。而基因组 DNA 基本上没有什么变化。

cDNA 的合成是分步进行的，抽提出高质量的 RNA 是合成 cDNA 的前提。表 18.1 显示的是以前合成 cDNA 所涉及的以及目前合成 cDNA 常用的酶。由于 cDNA 合成反应对条件的高敏感性，建议在第一次做时使用试剂盒。否则的话，可能会因为摸索条件而浪费大量的人力物力资源，且最终并不一定有稳定的好结果。绝大部分 cDNA 合成试剂盒是可靠且易于操作的。从每一个反应的成本来说，用试剂盒合成 cDNA 也是最经济有效的。并且这些试剂盒的反应体系可以得到大量的 cDNA。为方便读者理解，下面介绍 cDNA 合成的原理，并为研究者提供备用的实验方案。

表 18.1　合成 cDNA 常用的酶

酶	活　力	cDNA 合成中的作用
反转录酶(依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶)	5′→3′聚合酶活性	将 RNA 转变成 cDNA
	RNase H 活性(小)	底物包括 mRNA、hnRNA、tRNA、rRNA、病毒 RNA
DNA 聚合酶 I(Kornberg 酶)	5′→3′聚合酶活性 5′→3′核酸外切酶活性	第二链 cDNA 的合成(5′→3′核酸外切酶活性用于去除有缺口 mRNA；Gubler 和 Hoffman，1983)
DNA 聚合酶 I(Klenow 片段)	5′→3′聚合酶活性 3′→5′核酸外切酶活性	第二链 cDNA 的合成(经典 cDNA 合成法)
RNase H	切割 RNA：DNA 杂合体中 mRNA 的活性	切割活性为第二链 cDNA 合成提供大量引物(3′-OH)

续表

酶①	活　力	cDNA 合成中的作用
S1 核酸酶	单链特异性核酸酶(DNA 和 RNA)	经典合成法中去除茎环(该酶特异针对单链结构)
T4 DNA 连接酶	连接黏性末端或平末端	封闭磷酸二酯键骨架(…3′-OH＋p5′ X …)
T4 DNA 聚合酶	5′→3′聚合酶活性 3′→5′核酸外切酶活性	dscDNA 的平末端化；其外切酶活性是 DNA 聚合酶 I 的 200 倍
DNA 甲基化酶(*Eco*RI 甲基化酶)	甲基化酶活性	cDNA 限制位点的甲基化；保护 cDNA 不被 *Eco*RI 酶切
末端脱氧核苷酸转移酶	5′→3′聚合酶活性	依赖 Co^{2+} 时，在平末端上加核苷酸；依赖 Mn^{2+} 时，在凸出的 3′-OH 上加核苷酸
嗜热菌聚合酶(*Tth* polymerase)	反转录酶活性 5′→3′聚合酶活性	高温下第一链合成(Mn^{2+} 依赖性)；第二链合成与 PCR 扩增(Mg^{2+} 依赖性)
Taq 聚合酶	反转录酶活性 5′→3′聚合酶活性	低反转录酶活性(第一链合成)；第二链合成与 PCR 扩增

① 有些酶是经典方法合成 cDNA 时所用的酶，有些是用于在一个管子中完成 RT-PCR 的反转录酶，有些在第 19 章讨论。

18.2.1　第一链合成的注意事项

体内与体外合成核酸都有两个必需的条件。第一，需要模板，它根据 Chargaff's 规则(见第 1 章)指导互补链的从头合成。对于 cDNA 来说，模板是 mRNA。第二，有提供 3′-OH 的引物。3′-OH 基团对于所有使单个核苷酸连接在一起及支持链延伸的 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶来说，是非常重要的。记住，多核苷酸延伸的方向是 5′→3′，并且自始至终都是双链形成。合成的单链必须以反平行的方式与模板链配对。因此，若要合成出全长的 cDNA，引物必须要与 mRNA 的 3′末端互补。

cDNA 是分步合成的。每次一条链以总 RNA 或 poly (A)$^+$ RNA 为模板 (见第 5～7 章)。接着高温变性去除 RNA 的二级结构，小段 poly(T)❶ 引物，也就是常说的 oligo (dT)，退火后结合到 RNA 3′端 poly(A) 尾巴上。因为引物与 RNA 模板间的反平行碱基配对，所以引物可提供 3′端的—OH，支持互补于 RNA 模板的分子 (此后称为第一链 cDNA) 沿 5′→3′方向合成 (图 18.1)。

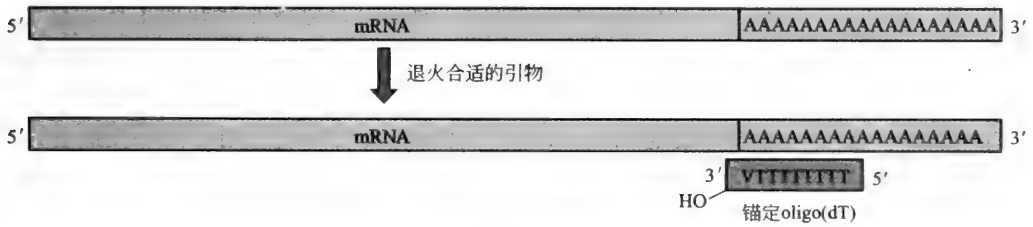


图 18.1

oligo(dT) 引物的 5′末端可以附加一悬挂序列 (悬挂序列内含有一些限制性内切酶的酶切位点) 或用于定向克隆❷的有用序列。这些附加的序列称为接头 (图 18.2)。

❶ 寡聚脱氧胸苷酸。

❷ 定向克隆是指将外源 DNA 方向性地插入到载体中克隆扩增。尽管可以灵活使用，但研究者若想要将 DNA 表达成蛋白质 (DNA→RNA→蛋白质)，一般都应该定向克隆。

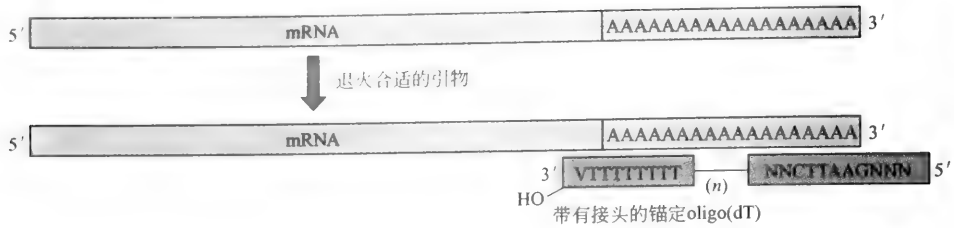


图 18.2

任何引物起始合成的方法都需要模板与引物支持第一链 cDNA 的合成。在 oligo(dT) 方面的主要改进，就是创新性地使用等摩尔混合的锚定 oligo(dT) 引物，其通式为 T_nV，其中 V= A，C，G。因此，锚定引物的序列是 5′TTTTTTTTTTTTA、5′TTTTTTTTTTTTC 和 5′TTTTTTTTTTTTG。引物 (V)3′末端的锚定核苷酸迫使引物与 poly(A) 尾 5′最末端碱基配对。引物以这种方式启动的结果，是使更有代表性的 cDNA 被合成，这些 cDNA 包含每种模板 mRNA 分子的大量编码部分。这些引物的工作是非常惊人的。

认识这一点极其重要，按照上面的引物设计，产生的 cDNA 是来自 poly(A)$^+$ 的 cDNA，而不是总 cDNA。因为并不是所有的 mRNA 都被腺苷酸化❶。为解决这个问题，随机六核苷酸或其他寡聚物可以用来引发第一链 cDNA 的合成。这些寡聚物从模板的内部而不是从模板的 3′末端引发反转录（图 18.3）。

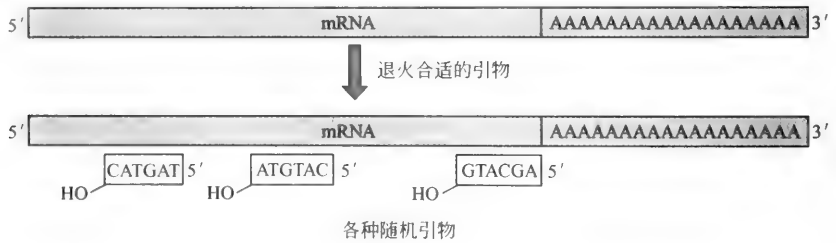


图 18.3

有的 poly(A) 尾可长至 200～250 核苷酸，随机引物排除了 cDNA 合成从 poly(A) 尾 3′最远端区起始的可能性。这种情况下，cDNA 第一链 5′末端相当明显的一部分可能由很多 T 组成。同时对于 5′端二级结构明显的 mRNA，随机引物也能非常好地工作。总之，与仅用 oligo(dT) 引物合成的 cDNA 相比，利用随机引物合成的 cDNA，通常更长并更具有代表性。

在笔者的实验室，通常将锚定 oligo(dT) 引物和随机引物混合用于同一反应管，可发生更有效的 cDNA 合成。这样既能消除 poly(A)$^-$ 转录物被排除在外的担心，又能扩增出更长的片段，其中很多是接近全长的 cDNA。合成第一链的条件参数一般不需要改变，唯一的差异是同时使用推荐量一半的每种引物。现在这是研究者的标准操作程序，在分析低丰度基

❶ 采用这种方法合成 cDNA，引物与 mRNA 3′末端配对。因此以这种方式构建的 cDNA 库不包含对应的 poly(A)$^-$ mRNA。科学家必须意识到，这些库是处于循环中。虽然不经常，但这些库会周期地面对如－80℃冰箱清理和重新整理这样的情况。当筛选可能是几年前合成的库时，引发 cDNA 合成的方法的知识可以影响实验结果的解释。考虑到 oligo(dT) 引物构建的 cDNA 库的缺点，很多更新的库在构建时使用随机引物合成第一链 cDNA。在笔者实验室合成 cDNA 时，在同一反应管中加入随机引物和 oligo(dT)

因时，它特别有价值（Bassett 等，2000；Bassett 等，2004）。如果使用总 RNA，有些研究人员偏向于只使用 oligo(dT)，阻止任何非 mRNA 反转录成 cDNA。笔者的观点是，通常 oligo(dT) 和随机引物一起可以得到非常满意的结果。如果打算用 cDNA 进行 PCR 或任何下游工作，只要引物设计正确，用总 RNA 和两种引物是不成问题的。

合成 cDNA 第一链所需的酶命名为“依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶”，通常称为反转录酶，简称“RT”。过去几年中，选择哪种反转录酶已成为一件很复杂的事情，需要预先计划。有多种反转录酶和说明可供使用。

AMV，来自鸟类成髓细胞瘤病毒。

MMLV，来自莫洛尼鼠白血病病毒。

改造的 RNase H^- 酶。

r*Tth*，来自嗜热菌[1]（Mn^{2+} 依赖性）。

经典的反转录酶有 AMV 和 MMLV。很多研究者喜欢用 AMV，因为它的反应性好，在 50℃或更高温度下有活性，更适宜于反转录一些较短的模板。很不幸，一些 AMV 反转录酶制剂有很高的 RNase H 活性，会降解反转录前 DNA 引物与 RNA 模板退火形成的 RNA：DNA 杂合体中的 RNA 组分，结果造成模板被剪切，伴随着 DNA 引物结合不稳定，使 cDNA合成量大大减少。相反，通常 MMLV 反转录酶的 RNase H 活性低得多，因此适宜于长片段的扩增，通常在 37～40℃间使用。笔者实验室常规使用 AMV 反转录酶（Promega and Roche Applied Science varieties）非常成功。

在实验室，如果反转录仍然是个头痛的问题，下面六点建议也许可以参考借鉴。

① 必须检查 RNA 的完整性。必须有证据表明，cDNA 合成反应中使用的 RNA 是完整的。并不需要精心制作的电泳装置，所需要做的是，进行迷你凝胶电泳，随后染色检测 rRNA 的存在和条带的弥散程度（第 8 章）。特别是对于以前提纯的存放很久的 RNA 来说，这是个简单有价值的实验。

② 正如很多酶那样，反转录酶的一些制剂可能污染了背景值的 RNase H 活性。分子生物学家把它看作污染活性。RNase H 的作用是使 DNA：RNA 双链中的 RNA 链形成缺口。在 cDNA 合成反应过程中，DNA 引物与 RNA 模板退火形成的杂合链就是 RNase H 攻击的目标。因为引物不能再与完整的 mRNA 结合，其结果就是引物不能延伸。如果反转录开始了，RNase H 活性必然干扰全长 cDNA 的合成，因为生长中的杂合物分子也是可能的底物。因为全长和总产率可能受到负面影响，所以保证使用 RNase H^- 的反转录酶是明智的。研发水平上，通过引入突变或完全除去 RNase H 活性对应的催化结构域，显著抑制或完全消除了 RNase H 的活性。这些酶的例子有，Promega 公司的突变和缺失修饰的 MMLV 反转录酶，著名的 Superscript Ⅱ（Invitrogen）和 BD PowerScript（BD Biosciences），其他销售商也有类似的产品。

③ 考虑在第一链合成反应混合物中加入明胶。明胶通常是 cDNA 合成试剂盒的组成分，它的作用是稳定反转录酶并改进其反应效率。使用明胶时，最终浓度为 10μg/ml。

④ 增强型的反转录酶可以在 50℃以上进行反转录反应。很多非凡的酶，现在可以在高温下进行 cDNA 合成。高温不仅可以提高 cDNA 合成的保真度，还可以非常有效地破

[1] 尽管 *Taq* 聚合酶也有 Mn^{2+} 依赖性的反转录酶活性，但相比 r*Tth* 要弱很多。因此，r*Tth* 仍是一个受欢迎的反转录酶。

坏 RNA 的二级结构，已经很清楚 RNA 二级结构在缩短第一链 cDNA 产物长度方面的作用。

⑤ 如果 cDNA 将被用于反转录聚合酶链反应（RT-PCR，见第 19 章），可以考虑很普及的一管、一反应的缓冲液系统。热稳定 r*Tth* 酶依赖于 Mn^{2+} 的反转录酶活性，结合创新的缓冲液系统，使得 cDNA 合成以及此后 PCR 扩增的整个过程仅需要准备一个反应管，然后封管，直到 cDNA 合成、扩增和进行分析前都不需要打开试管。r*Tth* 聚合酶的选择取决于支持第一链合成的引物类型［基因特异性引物大大优于 oligo(dT) 或随机引物］和必须保持的序列保真度（Mn 元素有副作用）。

⑥ 反转录酶和 RNasin（RNase 抑制剂，在第 4 章讨论过）总是保存在甘油储存缓冲液中，一定不能多次冻融。其他试剂在－20℃是长期稳定的。对于要做多次 cDNA 合成反应的研究者来说，准备 cDNA 混合工作液非常有好处。这也相当于同时做多个 PCR 时准备 PCR 工作混合液。将 PCR 必需的所有组分（缺一种）混合成大体积，然后再分装❶，这样避免了操作过程中因微量注射器导入的程序误差。

对于大部分分子生物学实验来说，每一种酶都有最适的反应条件（离子强度、pH、单价阳离子、二价阳离子）。缓冲液提供方式都是 10×第一链缓冲液或 5×第一链缓冲液（如 MMLV 或 AMV）。工作浓度一般应该被稀释成 1×。反应温度应该视不同的酶而定。然后研究者必须再加引物、RNase 抑制剂保护反转录前的 RNA；同时加入等物质的量浓度的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP（以后以 dNTP 表示）。第一链合成 cDNA 反应时间一般为 10min～1h。实际上 cDNA 第一链合成所需的组分与后面 PCR 扩增所需的组分是一致的。

典型的由 AMV 催化的 cDNA 第一链合成的反应条件如下：10mmol/L Tris，pH 8.3；50mmol/L KCl；5mmol/L $MgCl_2$；1mmol/L dNTP；3.0μg 引物［oligo(dT) 与随机六聚体的混合物］；20U RNasin；20U AMV 反转录酶；50～1000ng RNA；总体积为 20μl。比较方便的是，所需的第一链合成缓冲液是购买反转录酶时附加的，这样就减少了或者不再需要优化反应条件了。下面是如何做 cDNA 第一链合成加样的例子。注意反应分成两步，首先使 mRNA 变性，而不影响 RNasin 和反转录酶的活性。就如所有 RNA 操作一样，必须在整个过程中都使用无核酸酶技术。

① 准备混合反应液 1。

组　分	每个反应的量❷	组　分	每个反应的量❷
水	5μl	oligo$(dT)_{12-18}$(1.0μg/μl)	1μl
dNTP(10mmol/L)	1μl	共计	8μl
随机引物(2.0μg/μl)	1μl		

② 将 8μl 混合反应液 1 加到反应管中。

③ 加 2μl RNA❸（50～1000ng；保证每个管内有相同的量）。

❶ 笔者实验室大规模实验时，制备 1～2ml cDNA 混合工作液（除反转录酶和 RNasin 外），储存于－20℃。研究人员采用这种策略，使得化学品继续重复使用，实际上至少减少了一项程序误差。

❷ 如果为多个反应配置混合反应液，注意每个反应的体积乘以需要的总反应数目加 1 的计算值。这是标准程序，为了保证有足够的混合反应液应付微量注射器可能发生误差的情况。同样的程序也适用于第二链合成和 PCR 反应所用的混合反应液（第 19 章）。

❸ 不要将 RNA 直接加到混合反应液中，待混合反应液分装好后，再将单个 RNA 样品加到各管中。

④ 反应管 70℃加热 5min，冰上放置 2min。这一步骤的目的是 RNA 变性。

⑤ 准备混合反应液 2。

组　分	每个反应的量	组　分	每个反应的量
水	适量	AMV 反转录酶(20U/μl)	1μl
10×第一链缓冲液	2μl	共计	10μl
RNasin(20μ/μl)	1μl		

⑥ 将 10μl 的混合反应液 2 加到变性 RNA 的管中。

⑦ 25℃温育 5min。

注意　短时间低温孵育，①有助于引物与模板退火；②使反转录酶在下面的步骤中有更好的热稳定性，而使随机引物和/或 oligo(dT) 延伸反应更顺利。这通常会得到更长的 cDNA 产物。

⑧ 37℃或 42℃温育 60min，如果用的是热稳定酶或是增强型酶，可以 50℃孵育 50min。

注意　很多反转录酶都可以在高温下合成 cDNA。很多供应商处有各种选择。

⑨ 样品在 99℃加热 5min 灭活反转录酶。不进行此处理将会对后面的 PCR 操作有可重复的有害影响。

⑩ 现在新合成的第一链 cDNA 已可用于几种下游的实验分析。若要了解 RT-PCR 的具体细节，读者可以直接参考第 19 章。若为了建库而合成第二链 cDNA，读者可参考用户手册，下一节提供第二链 cDNA 合成的标准实验方案。

18.2.2　第二链合成的注意事项

克隆 cDNA 中的很多进展都属于支持第二链 cDNA 合成的各种策略。有趣的是，cDNA 第一链的合成原理与早期技术所使用的方法近乎相同。早期技术的方法是，在第一链合成完毕后，碱水解原始的 mRNA 模板，利用第一链 3′末端暂时形成的发夹作为引物，以第一链 cDNA 作为模板，支持第二链 cDNA 的合成。合成的双链分子由一单链的发夹连接。需要 S1 核酸酶消化（第 16 章）以去除发夹，使其能进行随后的载体插入（Efstratiadis 等，1976）。依据今天的标准，这是原始的方法。它导致对应于原 mRNA 5′端序列的丧失，而且使 cDNA 暴露在 S1 核酸酶的降解活性之下，而 S1 核酸酶极具攻击性，常常不可控制。

随后，Okayama 和 Berg(1982) 发展了一种新的方法，用带 oligo(dT) 尾的载体，而不是用 $oligo(dT)_{12\sim18}$，起始第一链的合成。产生的 RNA：DNA 是由连接接头（linker）连接而环化的分子。该技术的真正创新之处，包括使用 RNase H 和 DNA 聚合酶 I 的混合物。在第一链 cDNA 合成后，去除 mRNA 模板，以支持第二链 cDNA 的合成。在这一途径中，RNase H 使 RNA 产生缺口，并利用 DNA 聚合酶 I 内在的 5′→3′外切酶活性降解 mRNA。同时，DNA 聚合酶（Klenow 片段；Kornberg 酶的一个蛋白质水解片段，即 DNA pol I）的 5′→3′聚合酶活性，使用被剪切 RNA 的 3′-OH 作引物，合成第二链 cDNA。最后，因为 DNA 聚合酶不能黏合由 RNase H 产生的缺口，因此由 T4 DNA 连接酶修复第二链 cDNA 骨架，大大增加双链核酸在后面克隆步骤中的稳定性（图 18.4）。这方面的主要进展是 Gubler 和 Hoffman(1983) 的方法。该方法再次使用 $oligo(dT)_{12\sim18}$ 起始第一链 cDNA 的合成，接着用 Okayama 和 Berg 的 RNase H、DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶鸡尾酒合成第二链 cDNA。

Gubler 和 Hoffman 阐述的方法仍是 cDNA 合成的标准方法。因为分子的每个末端不可

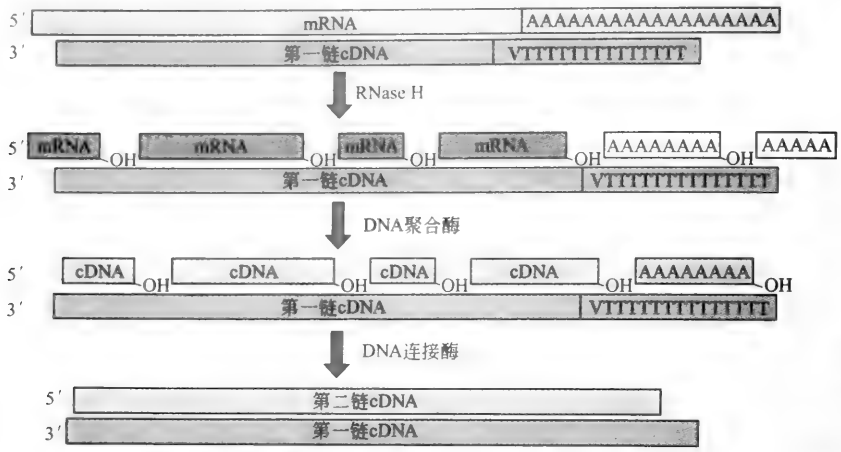


图 18.4

避免地会出现降解，因此这一方法合成的 cDNA 相对于原 mRNA 模板偏短。以这种方式合成 cDNA 不能制备正确的平末端。因此双链 cDNA 需要在 T4 DNA 聚合酶存在的情况下短时间温浴，以磨平末端，帮助它连接到载体中去。

第一链 cDNA、第二链 cDNA 合成完成后，合成分子的末端被修饰，而产生类似于适合克隆载体末端结构的黏性末端，这些载体有质粒、黏粒、噬菌体、噬菌粒等。如果 cDNA 由含有稀有限制酶酶切位点的接头引发合成，然后这些序列被剪切以构建“黏性末端”，这将提高连接效率。最近，已有报道利用位点特异性重组方法构建 cDNA 库（Ohara 和 Temple，2001；Ohara 等，2002；Invitrogen Gateway Technology）。

如果不用接头介导的 cDNA 合成方法，黏性末端❶也可以通过直接与连接接头（linker）连接产生，虽然这种平末端连接效率不是很高（图 18.5）。

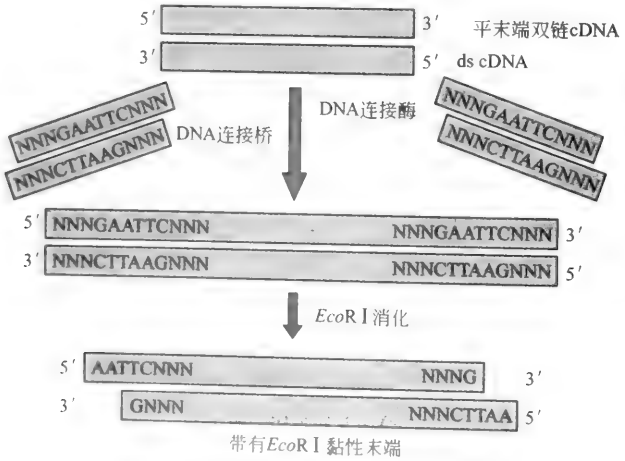


图 18.5

❶ 除了连接接头（linker）和接头（adapters）外，还有一种有关载体-插入片段连接非常老的方法，被称为同聚加尾法（homopolymerically tailing）。这种方法在[illegible]段时间，虽然很少，这种方法用末端脱氧核苷酸转移酶（末端转移酶，如片段-加 dGTP，使 cDNA [illegible] 脱氧核苷酸转移酶给载体加尾，但使用 dCTP。两者退火互补，形成互补的 poly(dC) 和 poly(dG) 片段，然后经 DNA 连接酶连接在一起。

在上面的例子中，新添加的限制酶酶切位点用相应的酶酶切之后，会产生黏性末端[1]。若需要定向克隆[2]，则可能也需要如前面所述，使用接头来实现。

需要在设计酶切位点时注意所含序列的接头方向。实际上，一般 cDNA 合成和克隆系统都为使用者提供连接接头和/或接头以方便连接选择的载体。使用 PCR 时，设计的引物末端必须与对应的克隆策略相符合。

18.3　核定 cDNA 合成的效率

为定量检测反转录的效率，以及作为不同样品标准化的依据，实验者可以考虑用 [α-^{32}P] dCTP 或 [α-^{3}H] dCTP 示踪第一链反应。测得的标记掺入量正比于新合成的 cDNA 的量。可以通过一份第一链 cDNA、第二链 cDNA 电泳，加上凝胶的直接放射自显影，评估放射性同位素标记的 cDNA 的质量和大小分布。理想状态时，曝光一定会显示凝胶上端呈现很多弥散的条带，条带越接近加样孔越好。虽然非常麻烦，但还有另外一种可能的方法。电泳分离 cDNA 后，用 SYBR 绿染色，用图像分析软件定量和比较凝胶上样品 cDNA 电泳弥散条带结果。是否进行碱变性凝胶电泳取决于实验者的爱好。研究者也可以选取一部分 cDNA 反应产物，用 0.1 体积的 0.1mol/L NaOH 变性，然后用 1.2%的非变性琼脂糖凝胶电泳。

18.4　连接的注意事项

在每一个连接反应中，载体和插入片段的分子摩尔比为 1∶1 时，可获得最大的连接效率。克隆建库时，载体与插入片段若接近于 1∶1，克隆会非常完全。如果只是要克隆某一类型的分子，而不是建库时，连接效率则不需考虑太多。转化细菌并将其涂布于选择性培养基（如 50μg/ml 氨苄西林或 12.5μg/ml 四环素）后，即使只出现一个克隆，并发现它含有目的片段插入，实验便是成功的。因为假阳性确实存在，所以最好至少有几个候选克隆供是否存在重组载体的检测。教训是，简单的克隆实验中，载体和插入片段的分子摩尔比是否是 1∶1 并不是鉴定的参数。

若感觉产生的重组克隆有问题时，可以计算可能达到的程度、参与反应末端皮摩尔（pmol）分子数，然后增加或减少某一种成分的质量，使载体与插入片段的末端比例达到 1∶1，通过计算完成连接优化。研究者必须计算插入片段和载体两者的末端皮摩尔分子数，然后在连接反应中使它们达到平衡。

$$\text{末端皮摩尔分子数}=\frac{\mu\text{g DNA}\times 2\times 10^{6}}{660\times \text{碱基数}}$$

式中　末端皮摩尔分子数——可参与连接反应的末端分子数（无论是插入片段或是载体）；

μg DNA——载体或插入片段的质量；

660——每个碱基对的平均分子量；

碱基数——载体或插入片段的长度；

---

[1] 使用限制酶产生黏性末端时，同样在内部的识别位点剪切，cDNA 长度会缩短。为排除这一问题，一个策略是，在连接接头连接和用限制酶消化前，使 cDNA 甲基化（如用 *Eco* R Ⅰ甲基化酶）。在此例子中，*Eco* R Ⅰ甲基化酶处理后的 cDNA，即使其内部有 *Eco* R Ⅰ酶切位点，也不能被 *Eco* R Ⅰ剪切了。

[2] 双链 cDNA 两端不同的限制酶位点允许插入片段以希望的方向连接。这一策略常用于 cDNA 将被表达的情况。

2×10^6——μg(10^{-6}) 与 pmol(12^{-12}) 的转换因子。

按每个分子有两个末端可以连接计算。

例如，打算作为插入片段的 575ng 的 DNA，长 852bp，约有 2.045pmol 末端：

$$\text{末端皮摩尔分子数}=\frac{0.575\mu g\times2\times10^6}{660\times852}$$

若要做克隆，这个 DNA 作为插入片段，研究者同样需要计算载体的末端皮摩尔分子数，使连接反应中两者的浓度相同。

如果准备克隆的是长度单一的插入片段，这种计算简单而直接。但若要克隆的插入片段是 cDNA 混合物时，情况就非常复杂，因为这些 cDNA 的长度非常不均一，并且某些 cDNA 的丰度比其他的高。这时候最值得做的策略是改变插入片段对载体的比例，进行一系列连接。例如，1∶0.25，1∶0.5，1∶0.75，1∶1，1∶1.25，1∶1.5，1∶1.75，1∶2。连接反应结束后，将连接产物转化进 *E. coli* 感受态细胞[1]，最常用化学转化方法制备理想的感受态细胞，也可以直接从公司购买（如 Promega）。

18.5 参考文献

Bassett, C. L., Nickerson, M. L., Cohen, R. A., and Rajeevan, M. S. (2000). Alternative transcription initiation and novel post-transcriptional processing of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that responds to short-day photoperiodic floral induction in morning glory (*Ipomoea nil*). *Plant Mol. Biol.* **43,** 43.

Bassett, C. L., Nickerson, M. L., Farrell, R. E., Jr., and Harrison, M. (2004). Multiple transcripts of a leucine-rich repeat receptor kinase from morning glory originate from different TATA boxes in a tissue-specific manner. *Molec. Gen. Genomics* **271(6),** 752.

Efstratiadis, A., Kafatos, F. C., Maxam, A. M., and Maniatis, T. (1976). Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. *Cell* **7,** 279.

Gubler, U., and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25,** 263.

Ohara O., Nagase, T., Mitsui, G., Kohga, H., Kikuno, R., Hiraoka, S., Takahashi, Y., Kitajima, S., Saga, Y., and Koseki, H. (2002). Characterization of size-fractionated cDNA libraries generated by the *in vitro* recombination-assisted method. *DNA Res.* **9(2),** 47.

Ohara, O., and Temple, G. (2001). Directional cDNA library construction assisted by the *in vitro* recombination reaction. *Nucleic Acids Res.* **29,** e22.

Okayama, H., and Berg, P. (1982). High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **2,** 161.

（姚成果译；金由辛　秦文明校）

[1] 与用质粒构建 cDNA 库比较，用流行的 λ 噬菌体载体的途径克隆构建的 cDNA 库是最有效的。因为 λ 噬菌体的嗜菌斑非常小，所以可以以比相应细菌转化高得多的密度铺 cDNA 库。筛选噬菌体库时，假阳性率也低得多，因此比菌落杂交有更好的灵敏度和分辨率。噬菌体库筛选后，研究者通常进行亚克隆实验（将插入片段从一种载体转入另一种载体）。很多推定的阳性克隆被再次鉴定。这些后续的操作必须进一步鉴定载体携带的插入片段，用质粒工作会方便很多。

第 19 章　反转录聚合酶链反应

19.1　基本原理

毫无疑问，聚合酶链反应[1]（PCR）的技术革命不仅对整个分子生物学领域产生了广泛的影响，而且还影响到了实验过程中一个最基本的问题——应该怎样着手解决这个实验问题。反转录聚合酶链反应（RT-PCR），即先由任何一种反转录酶（RT）催化核糖核酸（RNA）分子合成与之互补的 DNA（cDNA）序列，接着再经过标准的聚合酶链反应（PCR）扩增出大量的 cDNA。由于反转录酶（RT）在 cDNA 第一链合成过程中起着重要的作用，因此这一方法在研究基因表达的过程中被普遍称为反转录聚合酶链反应（RT-PCR）。最初这一方法被称为核糖核酸聚合酶链反应（RNA PCR），这似乎有点用词不当。正是由于 PCR 的快速性与有效性，RT-PCR 成了合成和分析 cDNA 的首选方法。

与以往分析 RNA 的方法相比，RT-PCR 的方法在分析基因表达量上是十分有效的。细胞裂解液中存在的转录本必定能通过反转录与 PCR 扩增出产物，而没有转录的基因在反应体系里不能提供反转录的模板，也就没有产物的产生。由于 PCR 的灵敏度很高，RT-PCR 是目前对表达量极低的转录本进行检测和定量时经常使用的方法。

19.2　聚合酶链反应概述

PCR 技术的广泛应用，无疑对所有生命科学的基础研究领域都产生了巨大的影响。古老的劳动力密集型的分子生物学方法（大约 1985 年）已经逐渐退出了历史的舞台。取而代之的是更快更精确的被形象地称为“引物介导，酶促扩增的特定基因组序列或 cDNA 序列”的方法（Saiki 等，1985；Mullis 等，1986；Mullis 和 Faloona，1987）。极微量的模板在几个小时内就可扩增数百万倍。PCR 技术在用 RNA 作为基因表达参数的各个领域，如传染病的研究、基因突变、法医鉴定、基因家族成员相关性、组织和细胞的转录活性等，都显示了巨大的应用潜力。当然，并非要将以往的经典方法完全舍弃，因为 PCR 技术也有如下一些不可避免的缺点。

① 要想反应正确地进行，研究人员必须选择适当的引物序列。

② 与模板配对的引物，在 3′末端不能有错配。

---

[1] PCR 方法专利所有权目前由 Roche Molecular Systems，Inc. 和 F. Hoffmann-LaRoche Ltd. 所有。要在专利许可范围内使用 PCR。PCR 应使用被授权的热循环仪。需要详细的询问，请联系 the Director of Licensing，Applied Biosystems，850 Lincoln Centre Drive，Foster City，CA 94404。

③ 参加反应的模板（如靶标），必须经过纯化以利于引物的退火和随后的延伸反应。

④ 反应体系中的诸多组分要经过优化，直到能够得出明确的产物。

⑤ PCR 产物的长度通常比原来的模板长度短。在 RT-PCR 过程中，产物可以经过纯化作为 RNA 印迹（Northern 印迹）分析的探针来确定 mRNA 模板的真正长度，这至少是一种确定 PCR 产物的方法。

笔者认为对于屡次遇到困难的研究人员，不管是新手还是老练的分子生物学家，千万不要把 PCR 技术当作一项可以医治百病的良药。另外，即使已经精通了基本的核酸分离、处理和储存的方法，也不要摒弃其他实验方法而只专注于 PCR 技术。有很多学习分子生物学的学生，误认为 PCR 可以解决实验中遇到的一切问题，其实这是十分错误的想法。

关于 PCR 的原理，陈述和讨论的文章非常之多，不能一一列举。如果想要系统地了解，读者可以参阅综述（Dieffenbach 和 Dveksler，2003；Innis 等，1999；McPherson 和 Hames，1995；Sellner 和 Turbett，1998）。此外，读者可以通过下面对 PCR 的概述，进行简要的了解。

首先，PCR 反应的进行依赖于体系中的引物。准确说什么是引物呢？在本文中，引物就是一段短小的单链 DNA 序列，也就是通常所说的寡核苷酸，是由研究人员确定的人工合成的特异序列。合成引物的标准如下。

① 引物长度通常小于 30 个碱基，实验中常用的引物一般为 20～25 个碱基长。

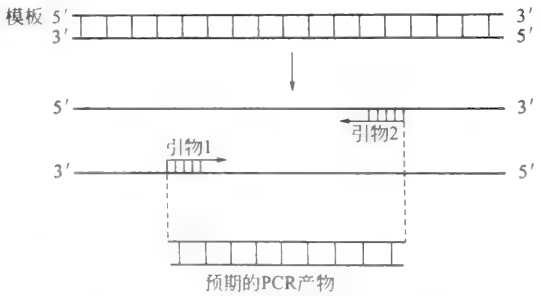
② 引物是单链的。

③ 引物 3′末端必须为羟基，这样才可以通过 DNA 聚合酶在其上加上其他核苷酸。5′末端没有特殊的要求，可以有任何修饰。

④ 引物 3′末端的最后两个碱基必须与模板完全配对，而 5′末端可以不与模板配对。

⑤ 引物必须与作为模板的基因组 DNA 或 cDNA 有一定程度的互补配对。

要想通过 PCR 扩增一段 DNA 序列，就需要一对引物。这对引物要设计成与热变性模板的两条链分别互补配对。而且它们的 3′末端是朝向对方的。这样经 PCR 得出的产物就是这两条引物 5′末端之间的序列。如下所示：



两条引物的物质的量浓度必须相等，这样模板的两条链才能对称地进行扩增，因此这种 PCR 也被称为“对称性 PCR”。如果两条引物的浓度不同，这种非对称性的反应将使模板的一条链得到扩增。通过合成引物的不同，PCR 反应可以有对称性 PCR（Saiki 等，1985）和非对称性 PCR（Gyllensten 和 Erlich，1988）；还可以有其他各种不同的扩增形式，如反相 PCR（Ochman 等，1988；Triglia 等，1988）、RT-PCR 及 cDNA 末端快速扩增［即通常所说的互补 DNA5′末端快速扩增和 3′末端快速扩增（RACE）］（Frohman 等，1988；Frohman，1995）。

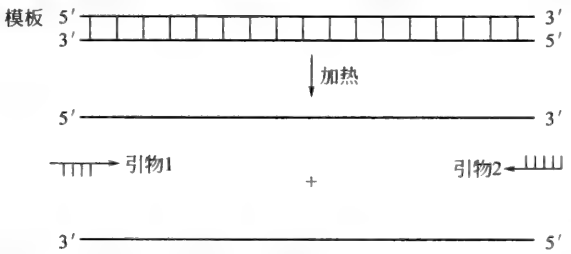
PCR 反应由很多循环组成，每个循环都分为三步，这三步之间的温度有显著的变化。通过 25～30 个这样的循环，模板分子就可以得到扩增（表 19.1）。每个循环中的三步具体如下。

表 19.1　PCR 理论上的指数扩增

循　环　数	相对产物量	以 2 为底的指数(2^n)	循　环　数	相对产物量	以 2 为底的指数(2^n)
1	2	2^1	19	524288	2^{19}
2	4	2^2	20	1048576	2^{20}
3	8	2^3	21	2097152	2^{21}
4	16	2^4	22	4194304	2^{22}
5	32	2^5	23	8388608	2^{23}
6	64	2^6	24	16777216	2^{24}
7	128	2^7	25	33554432	2^{25}
8	256	2^8	26	67108864	2^{26}
9	512	2^9	27	134217728	2^{27}
10	1024	2^{10}	28	268435456	2^{28}
11	2048	2^{11}	29	536870912	2^{29}
12	4096	2^{12}	30	1073741824	2^{30}
13	8192	2^{13}	31	2147483648	2^{31}
14	16384	2^{14}	32	4294967296	2^{32}
15	32768	2^{15}	33	8589934592	2^{33}
16	65536	2^{16}	34	17179869184	2^{34}
17	131072	2^{17}	35	34359738368	2^{35}
18	262144	2^{18}			

注：多个循环 PCR 产物的理论累积量为 2^n，这里 n 表示已完成的循环数。但实际上，由于引物和 dNTP 的消耗，多次样品热变性（92～95℃）对聚合酶带来的累计负面影响以及其他各种因素的影响，模板的实际扩增量并没有这么多。产物的累积在初期的几个循环里是按照指数增长的，然后在随后的循环里就进入了所谓的“平台期”。这时虽然聚合酶还有活性，产物却并非以指数增长的形式累积。

① 热变性。这一步的目的是高温使模板分子的双链得到解离变成单链，同时也可以使引物内或引物之间可能形成的二级结构解开[1]。这对下一步模板与引物的退火是必需的。要想得到 PCR 产物，完全的热变性是不可或缺的。热变性如下所示：

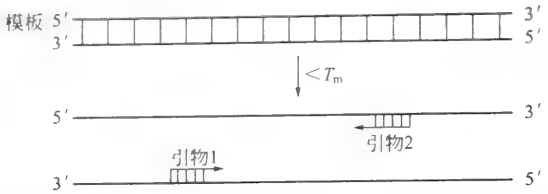


热变性所需的温度和时间取决于模板分子的配对性及（G＋C）含量。因此，对模板性质了解越多，就越容易对以后的反应进行优化。通常基因组 DNA 样品需要延长热变性的时间来确保双链的完全解离。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 的失败，通常都是由于在开始的时候模板没有完全热变性，从而大大影响了其后循环的效果所致。一般常用的短线性 DNA 的起始热变性温度为 94℃，时间为 1min；对于复杂的基因组 DNA 需要 10min。

② 引物退火。这一步的目的是使引物与模板在互补配对的位置杂交，从而为下一步的 DNA 合成提供 3′末端的羟基（3′-OH）。当引物与模板退火时，引物的 5′末端就确定了第一

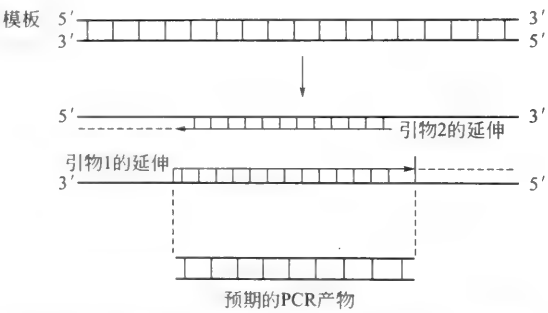
[1] 如何防止引物分子内及分子间的碱基配对，请参阅 19.5 引物设计一节中的建议。

轮循环完成后（RT-PCR 是第二轮循环完成后）的 PCR 产物的大小。在退火进行时，反应管中的温度不应超过任何一个引物的解链温度（T_m 值）。因此，虽有特例，退火温度通常都设定在比所用引物最低计算 T_m 值低 1～2℃为宜。引物退火如下所示：



此外，模板与引物互补配对的序列必须完全变性，否则引物退火将无法进行[1]。因此，退火温度是 PCR 过程中变化性最强的，并且直接取决于引物的序列。常用的退火温度为 50～68℃，反应时间为 2min。

③ 引物延伸。这一步的目的是从引物配对的位置沿着模板分子进行延伸反应，合成 PCR 产物。这是 PCR 产物合成的核心步骤。这一步的进行需要至少一种热稳定性的 DNA 聚合酶，如 *Taq*（*Thermus aquaticus*）或 *Tth*（*Thermus thermophilus*），能够在较高的温度下进行延伸反应。这些酶可以承受热变性过程中的高温以及在引物延伸过程中一般为68～72℃的温度。引物延伸如下所示：



在前两轮的循环中，引物延伸反应会超出另一链引物 5′末端规定的范围，从而产生 PCR“长产物”和“中间产物”。在第三轮循环中，反应又会产生“短产物”，即预期的产物以指数级累积。中间产物在整个反应过程中都会产生，但只以算术数级累积，在整个产物量中微乎其微（表 19.2）。但是非特异性产物的量却不容忽视。此外，热稳定性的聚合酶在高温下很少会出错，但是并不是所有的热稳定性酶都有校对活性。由于 *Taq* 聚合酶有很高的出错率，许多新的实验流程推荐用混合酶（如在同样条件下起作用的两种热稳定性的聚合酶）来提高产物的量并确保扩增过程中的精确度。

表 19.2　PCR 的产物量的分布

循环数(n)	每种类型产物的相对量			
	长产物(不变)	中间产物($2n-2$)	短产物(2^n-2n)	总量(2^n)
1	2	0	0	2
2	2	2	0	4
3	2	4	2	8
4	2	6	8	16
5	2	8	22	32

[1] 参阅 19.6 优化程序一节中的建议

续表

循环数(n)	每种类型产物的相对量			
	长产物(不变)	中间产物($2n-2$)	短产物(2^n-2n)	总量(2^n)
6	2	10	52	64
7	2	12	114	128
8	2	14	240	256
9	2	16	494	512
10	2	18	1004	1024
11	2	20	2026	2048
12	2	22	4072	4096
13	2	24	8166	8192
14	2	26	16356	16384
15	2	28	32738	32768
16	2	30	65504	65536
17	2	32	131038	131072
18	2	34	262108	262144
19	2	36	524250	524288
20	2	38	1048536	1048576
21	2	40	2097110	2097152
22	2	42	4194260	4194304
23	2	44	8388562	8388608
24	2	46	16777168	16777216
25	2	48	33554382	33554432
26	2	50	67108812	67108864
27	2	52	134217674	134217728
28	2	54	268435400	268435456
29	2	56	536870854	536870912
30	2	58	1073741764	1073741824

注：在典型的对称反应中，PCR 产物的累积主要分为三种形式，即长产物、中间产物和短产物。从表中总量一栏可以看出反应产物是以指数级快速累积的，而其中绝大多数是短产物。中间产物是以算术数级逐渐累积的。PCR 产物在反应结束时的量直接取决于实际的扩增效率，这个效率通常达不到表中所列出的 100%。

总而言之，PCR 基本就是重复以上介绍的三步：变性、退火和延伸。虽然 PCR 产物的量在前几轮循环并不是很多，但经过 20 轮或更多轮的循环，就可以得到大量的可以用于其他实验的产物。不管以 PCR 为基础的技术被冠以何名，其实根本上都是这几步的重复。

19.3　反转录聚合酶链反应基本方法

以基因组 DNA 或载体 DNA 为模板，进行 PCR 扩增的过程是十分简单的。同样的原理也可以应用于 RNA 的扩增，只需要在 PCR 前加上一步，即将 RNA 模板变为 cDNA 即可。为了更清楚理解基因调控所设计的任何实验，都是十分的复杂。因为这种复杂性，从而控制 RT-PCR 成功与否的条件，比分子生物学的其他所有技术都要繁杂得多，因此就需要结合实践经验仔细地预先计划好各个实验条件。

传统 cDNA 的合成就是全长或是所需长度 cDNA 分子的合成。这个目的能否实现，直接与 RNA 的起始数量与质量、cDNA 第一链的合成所用的方法及引物延伸反应通过 RNA 二级结构和发夹结构向前行进的能力有关。由于 PCR 卓越的灵敏性和扩增能力，对于 PCR 的扩增能力与识别能力来讲，起始 RNA 的量并不显得十分重要。而与之相比，传统的克隆

方法要有足够的起始 RNA 的量，这是不可或缺的条件。另外，由于 PCR 的引物“框出”了扩增的区段，所以这种克隆方法比传统的 cDNA 合成技术和 Northern 杂交分析更难区分部分降解的 RNA。

显而易见，RT-PCR 是一个两步的反应。首先，纯化的 RNA 由反转录酶（MMLV、AMV、Superscript 或 Mn^{2+} 依赖的 r*Tth*）催化，通过正确的引物进行反转录反应[1]。RT-PCR 应该在一个反应管中进行，还是应该分别在两个反应管中进行，不同的实验室有不同的做法，并没有定论。最新的改革建立了通常所说的单管 RT-PCR 方法。简单地说，单管 PCR 反应体系中包含了 RNA 模板反转录所需的，以及其产物 cDNA PCR 扩增所需的所有的反应组分。这种方法最大优点就是只要加好反应组分，并盖上反应管的盖子后，直到对 PCR 产物进行电泳或使用其他方法鉴定时，都不需要打开反应管的盖子。在实时定量 PCR 时，甚至不需要用电泳进行定量。

另一种单管 RT-PCR 的方法，是使 *Taq* 聚合酶与抗 *Taq* 的抗体结合保持失活的状态，反转录反应照常进行。当反应体系加热到 95℃时，反转录酶和抗体均变性失活，就释放出了有活性的 *Taq* 聚合酶，PCR 反应就可以顺利地进行了。还有一种方法，就是用同时可以催化两个反应的酶（如 r*Tth*），既可以进行反转录反应，又可以在含有二价锰离子的 *N*-二（羟乙基）甘氨酸缓冲液中进行 PCR 扩增反应。再有一种方式，含有氯化钾和硫酸铵的缓冲体系，可在退火温度和二价镁离子浓度的动力学范围外也保证很高的特异性，从而可以减少对优化的需要。使用更好的仪器、现在很多研究人员对反应有更好的理解以及其他的一些改革，所有这些改进大大减少了起始 RNA 的用量，有时低至亚纳克级。这种数量级的 RNA 需求量，使研究人员使用单个细胞进行 PCR 具有非常现实的可能性。

如果在实验中遇到了 RT-PCR 特异性的问题，就可以参考以下的方法。最好可以使用热启动的模式。另外，使用降落 PCR（touchdown PCR）方法可以大幅度地提高反应的特异性。简而言之，降落 PCR 开始使用的退火温度比引物的 T_m 值稍高，随着反应的进行，每一轮的退火温度都降低一个定量，通常设定为 0.5℃，直到反应的退火温度降低到比所有引物最低的 T_m 值低 5℃为止。这样反应的结果，在最初的几个循环里没有非特异性产物产生，当反应温度降低到引物的退火发生时，引物将只与完全配对的序列相互作用。当反应达到最低退火温度时，预期的特异性产物的量已大大超过了在最后几轮反应中形成的非特异性产物。这种方法能够使容易产生非特异性产物的引物反应得到很高的特异性（图 19.1）。

在非单管 RT-PCR 反应体系中，通常第一链反应的产物是 RNA：DNA 杂合体。在第二个反应中，PCR 原理使最初的 RNA 模板被取代，并且合成和扩增第二链。在 PCR 第一轮循环开始的时候，热变性和 PCR 反应缓冲液所提供的类似于碱性的环境使 RNA：DNA 链变性，RNA 发生碱水解[2]。这样就可以使序列特异性的引物在第一轮循环里可以与模板进行退火。当然，由于这时只合成了 cDNA 的一条链，只有一条引物可以找到与之配对的

[1] cDNA 第一链的合成过程中可以使用传统的下游引物，如 oligo(dT)$_{15-18}$、随机引物或基因特异性引物。反应产物是稳定的单链 cDNA 分子，可以作为下一步 PCR 扩增的模板。

[2] RT-PCR 与传统的 cDNA 合成方法相比有许多优点，最值得一提的是它的高速与灵敏性。不同于现在仍然常用的 RNase H 介导的第二链 cDNA 合成法（Gubler 和 Hoffman，1983），起始 RNA 模板的碱水解和直接合成第二链 cDNA 省去了各种沉淀步骤和其他复杂的处理过程。通过合成非特异性引物，如 oligo(dT) 和混合的随机六核苷酸或 nonomers，用 PCR 的方法可以合成整个文库，文库可保存多年用于逐渐或完全鉴定其特征。相反，一个适当长度的序列特异性引物就可以通过扩增得到单一的 PCR 产物，这种方法叫作锚定 PCR。这一方法将在本章的后文做详细的描述。

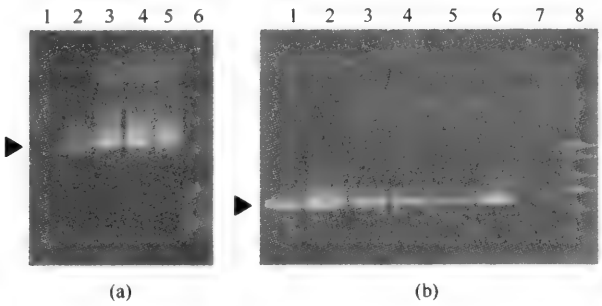


图 19.1　降落 PCR。即使温度接近 T_m 值，引物有时也会与模板有非特异性的相互作用。通过从高于 T_m 值的起始温度逐渐降低退火温度，只有完全配对的引物：模板双链才可以稳定存在并得到扩增。(a) 五个 cDNA 第一链样品（1～5 泳道）57℃退火进行的 PCR。理论上，这些引物可以产生单一的 365bp 的 PCR 产物，如箭头所示。但是非特异性产物清晰可见。第 6 泳道为 PCR 的分子量标准。(b) 六个 cDNA 第一链样品（1～6 泳道）进行逐渐降温的 PCR。退火温度从 65℃降到 55℃，每个循环降低 0.5℃，然后再进行 15 轮循环。在 1～6 泳道中的预期位置都观察到单一的产物。第 7 泳道是空白，第 8 泳道为分子量标准。(a) 和 (b) 中的 PCR 产物的长度是相同的，但不是同一块凝胶上电泳的结果

模板。第一轮循环的引物延伸反应产生了 cDNA 的第二链。第一轮循环完成后，新合成的 cDNA 双链将以对称的形式进行扩增（图 19.2）。

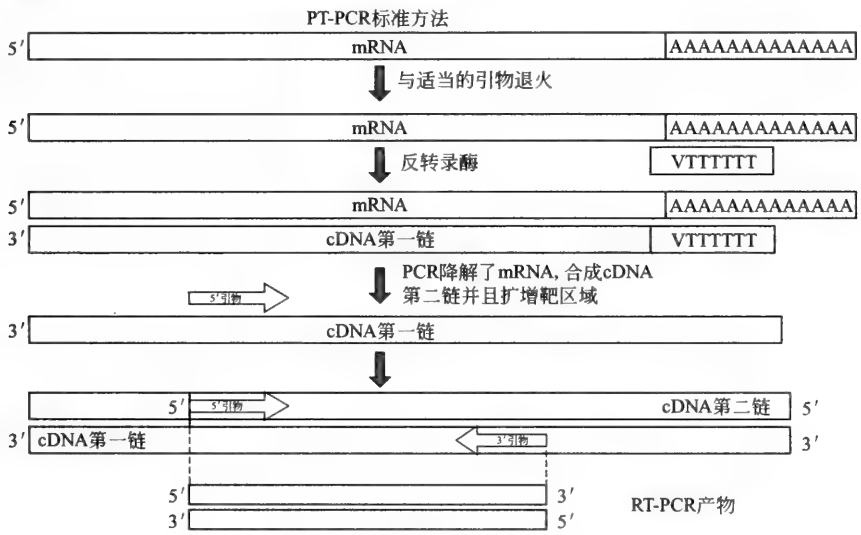


图 19.2　RT-PCR。mRNA 通过反转录酶的作用生成 cNDA 第一链。随之 mRNA 模板被降解。PCR 第一轮循环合成了 cDNA 第二链，从第二轮循环开始，cDNA 双链得到扩增。反应中可以选择多种不同的引物进行扩增

在 PCR 技术发明以前，完成第一链合成后，cDNA 第二链的合成由外加的 DNA 聚合酶起始，通常不除去或灭活反转录酶。这一点十分有用，因为 DNA 聚合酶和反转录酶共同作用可以增强解开二级结构的能力，二级结构影响被合成双链 cDNA 的长度。但是，现在除了 Mn^{2+} 依赖的 r*Tth* 和 *Taq* 活性外，反应时都要将 AMV 和 MMLV 反转录酶进行热失活，否则将影响随后的反应（Kawasaki，1990）。

有人可能会认为，通过 RT PCR 检测转录产物就像基因组 DNA 的扩增一样简单，因为即使低含量的 mRNA 在细胞中都有许多拷贝数。实际上并不是这样，因为在反应过程中起决定作用的是反转录酶。由于反转录酶对于不同样品进行反转录的能力变化很大，甚至是来自于同一份反应混合物，RT-PCR 反应样品的标准化仍然十分重要。因此，cDNA 第一链合成的效率是 RT-PCR 成功与否最重要的决定因素。

19.4 实验室设计

与非 RT-PCR 的正常危机相比，由于 RT-PCR 增加了步骤，来自储备液及下游的反应给扩增子（amplicon）污染的机会大大增加了。要解决这些问题，如果研究人员的实验室为样品准备和 PCR 扩增分别设计了指定的区域，那么在做 RT 反应时就一定要在样品准备区域，而不能在 PCR 扩增区域。每个区域都应该配备专用的一套微量移液器、实验服及其他设备。除了反应管及实验中将用到的溶液，任何东西都不能从一个实验区域移动到另一个实验区域。典型的实验室设置如图 19.3 所示。虽然为每一个过程都准备一个单独的房间是不太实际的，但是最好还是将实验室设计成如图 19.3 那样，实验区域间只能单向移动。如果实验室的空间十分狭小，那么最明智的做法就是将其他三个区域与凝胶电泳和 PCR 产物分析区域尽量分开。如果发生交叉污染，则实验室的工作将停滞不前。

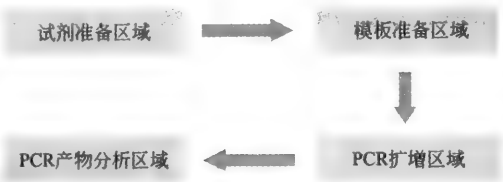


图 19.3 进行 PCR 时工作区域或实验室空间的最佳安排。试剂、模板和其他材料只能以箭头方向移动，而绝对不能返回到前一区域。同时，每一个区域都要配备一套微量移液器及实验服，并且不能从一个区域移动到另一个区域。反应储备液和样品管的单方向移动是避免污染的关键

19.5 引物设计

要想成功地进行一个 PCR，就需要一对正确设计的引物。反应中的两个引物所使用的术语比较混乱。为了明确区分这些术语，每个引物的不同命名在表 19.3 中列出。例如，下游引物就是距离 mRNA 模板 3′末端最近的与模板配对的引物，参与了 cDNA 第一链的合成。下游引物在其他命名法中也被称为 3′引物。上游引物与新合成的 cDNA 第一链互补配对，并且靠近起始 mRNA 模板 5′末端。如下所示：

在其他命名法中上游引物也被称为 5′引物。通常引物设计直接依据已经公布的 DNA 序列，如基因组 DNA、cDNA 或基因间区域。在合适的反应条件下，自然界的任何一段核酸序列都可以通过使用正确设计的引物而得到扩增。按照惯例，公布的 DNA 序列只列出

DNA 的一条链即编码链，书写时从 5′端到 3′端。当研究人员要为一段已知序列设计引物时，就必须明了还有另一条链的存在，并且与给出的序列是反向互补配对的。要为已公布的序列设计引物，并保证提取方向的正确与序列的正确，就需要遵守以下最基本的原则。

表 19.3　基本引物命名原则

5′引物(5′primer)	3′引物(3′primer)
上游引物(upstream primer)	下游引物(downstream primer)
正向引物(forward primer)	反向引物(reverse primer)
正义引物(sense primer)	反义引物(antisense primer)
(+)引物	(−)引物
Watson	Crick

注：左边列出的术语均可以用来描述与 mRNA5′末端相关的引物。同样，右边列出的术语均可以用来描述参与扩增的靠近 mRNA3′末端的引物。也可以使用更正式的用法将引物称作寡核苷酸链或寡核苷酸（oligos）。

① 上游引物的序列与公布的编码链的序列相同。

② 下游引物的序列与公布的编码链的序列反向互补配对。

为了确保选择了正确的引物序列，初学者最好写下发表序列的两条链，并标明方向。确保设计的两条引物分别与两条链反向互补配对，并且两条引物的 3′-羟基末端相互指向对方，从而框出需要扩增的序列。

类似的原则也用于 RT-PCR 引物的设计：如果已知一段 mRNA 序列，其序列与将其转录出来的 DNA 编码链的序列是相同的，只是由尿苷代替了胸苷。因此，如果 RT-PCR 的下游引物不选择 oligo(dT)，而选择使用特异性引物时，应选择 RNA poly(A) 尾巴起始位置上游的一段与 RNA 反向互补的序列。上游引物的序列除了由胸苷代替了尿苷外，其他与靶 mRNA 的序列相同。另一点特别值得注意的是，所有引物序列的书写方向都是从 5′端到 3′端，这一点对于上游引物和下游引物同样适用。如果引物序列的次序写错了，所得的引物将不起作用，全部过错都出在写序列的人。

例如，已知 mRNA 的序列如下：

GAGCCGCACA　CCUGGGAUCC　GAUAAGAACA　CGGAGCGAUU　AUUUUAUCUA
GCUAUGCUUA　GAGAGAUGAC　CGAGUAGCGA　CUAUUUUACC　AGCUUUUUUG
CGCGAUCGAC　CGAUCGACGA　AACAACAACA　CCCGCAACAG　CACGCGAGCG
AGACGAGAUU　CUACUAUGGG　UAAGUAGAAC　CCCAGACGAU　CACUCGCUAA
CGCUAUCGAG　CUAGUAGGAU　GCGUGUGCGC　UCGCUGCUAG　CGCUCGAGGC
UAAGUAGAAC　CCCAGACGAU　AGAAAAAAAA　AAAAAAAAAA　AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA　AAAAAAAAAA　AAAAAAAAAA　AAAAAAAAAA　AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA　AAAAAA

设计一对引物，长 20 个碱基，能够产生一段 PCR 产物包括了 mRNA 的 6～190 的核苷酸。

解答：

5′引物的序列　5′ GCA CAC CTG GGA TCC GAT AA

3′引物的序列　5′ ATC GTC TGG GGT TCT ACT TA

为便于阅读序列，通常将核苷酸写为 3 个一组。

寡核苷酸引物序列的信息能够从已公布的序列数据库中得到，也可以来自于相同或不同物种的相关基因的序列，还可以从目的基因编码蛋白质的氨基酸序列中得到。用最后一种方法就遇到了一个问题：基因编码的兼并性，即某些氨基酸有多个密码子。

当基于已知肽段序列的信息设计引物时，一种策略是检查此肽段是否有这样的氨基酸簇存在，即编码簇中的氨基酸只有 1 个或 2 个密码子。单密码子的氨基酸有甲硫氨酸（Met，M）和色氨酸（Trp，W）。但是 5 个或 6 个单密码子氨基酸相连是十分少见的，并且即使有，它的基因也可能早已被克隆了。其他氨基酸都有两个或两个以上的密码子（表 19.4）。在多密码子的情况下，研究人员必须了解在特定的物种中对于不同密码子使用的偏好性。没有直接的核酸序列信息，要想设计确定的序列作为引物或探针的可能性很小。作为普遍的指导原则，应尽量避免使用有 6 个密码子的氨基酸（包括精氨酸、亮氨酸和丝氨酸）。如果可能的话，多合成一些 3′引物和 5′引物，并且在 PCR 过程中尝试使用不同的组合来进行验证。

表 19.4　兼并引物设计密码子使用表

氨　基　酸	DNA 密码子	RNA 密码子	缩　　写	简　并　率	符　　号
甲硫氨酸	ATG	AUG	Met	1	M
色氨酸	TGG	UGG	Trp	1	W
天冬酰胺	AAT AAC	AAU AAC	Asn	2	N
天冬氨酸	GAT GAC	GAU GAC	Asp	2	D
半胱氨酸	TGT TGC	UGU UGC	Cys	2	C
谷氨酰胺	CAA CAG	CAA CAG	Gln	2	Q
谷氨酸	GAA GAG	GAA GAG	Glu	2	E
组氨酸	CAT CAC	CAU CAC	His	2	H
赖氨酸	AAA AAG	AAA AAG	Lys	2	K
苯丙氨酸	TTT TTC	UUU UUC	Phe	2	F
酪氨酸	TAT TAC	UAU UAC	Tyr	2	Y
异亮氨酸	ATA ATC	AUA AUC	Ile	3	I
	ATT	AUU			
缬氨酸	GTA GTC	GUA GUC	Val	4	V
	GTG GTT	GUG GUU			
脯氨酸	CCA CCC	CCA CCC	Pro	4	P
	CCG CCT	CCG CCU			
苏氨酸	ACA ACC	ACA ACC	Thr	4	T
	ACG ACT	ACG ACU			
丙氨酸	GCA GCC	GCA GCC	Ala	4	A
	GCG GCT	GCG GCU			
甘氨酸	GGA GGC	GGA GGC	Gly	4	G
	GGG GGT	GGG GGU			
精氨酸	AGA AGG	AGA AGG	Arg	6	R
	CGA CGC	CGA CGC			
	CGG CGT	CGG CGU			
亮氨酸	CTA CTC	CUA CUC	Leu	6	L
	CTG CTT	CUG CUU			
	TTA TTG	UUA UUG			
丝氨酸	TCA TCC	UCA UCC	Ser	6	S
	TCG TCT	UCG UCC			
	AGT AGC	AGU AGC			
无义密码子	TAA TAG	UAA(赭石)	终止		
	TGA	UAG(琥珀)	终止		
		UGA(乳白)	终止		

简并引物是一些相似的引物分子的混合物，这些分子至少在一个位点上是不同的。简并引物在研究未确定的序列如基因家族成员以及进化过程中的保守序列的特征时是十分有用的。使

用简并引物有利于一系列相关序列的退火和扩增，随着反应循环具体条件的不同，这些序列的特征也有很大的差异。例如引物：5′GGN CCG TCR TCR AAW GTC ARG TA，长度为 23 个核苷酸，由于在 3 位、9 位、12 位、15 位和 20 位上有变化的核苷酸，这一引物有 64 倍的简并率。引物的简并率是每个位点的简并数的乘积（表 19.5）。这就是说上述所示的引物实际上包含了 64 种不同的分子，可以与 64 种碱基改变的形式互补配对。由于某些基因在大多数生物体中都有高度保守的区域，简并引物将有助于从特定物种的基因组中钓出特异序列。但是随着引物简并性的增加，特异性就降低了。但是至少想要得到的序列也在产物当中。减少引物简并率的一种方法是在引物中掺入次黄苷。次黄苷是一种嘌呤核苷、可以与腺苷、胞苷、鸟苷形成碱基配对，它与胸苷的作用较弱。因此，在设计引物时，在不确定的位置上由次黄苷代替，将显著地降低简并率。当已知一蛋白质基因的氨基酸序列，并想回溯得到相应的基因序列时，也可以使用简并引物。在订购合成引物时，可以使用表 19.5 中列出的简并引物的标准符号。

表 19.5　引物设计所用核苷酸的标准缩写

核　苷　酸	常用符号	缩　　写	简　并　率
腺苷	A	A	1
胞苷	C	C	1
鸟苷	G	G	1
胸苷	T	T	1
尿苷	U	U	1
次黄苷	I	I	1
嘌呤核苷	A/G	R	2
嘧啶核苷	C/T	Y	2
腺苷，胞苷	A/C	M	2
鸟苷，胸苷	G/T	K	2
腺苷，胸苷	A/T	W	2
胞苷，鸟苷	C/G	S	2
胞苷，鸟苷，胸苷	C/G/T	B	3
腺苷，鸟苷，胸苷	A/G/T	D	3
腺苷，胞苷，胸苷	A/C/T	H	3
腺苷，胞苷，鸟苷	A/C/G	V	3
任意核苷酸	A/C/G/T	N	4

注：表中列出了某些特殊核苷酸的习惯缩写及合成 PCR 所需引物时这些核苷酸带入的简并率。

“多重”PCR 是用几套引物同时扩增出一段或几段靶序列的过程，其中的引物不必简并化。但是将反应温度设定在符合所有引物的 T_m 值的范围内是十分重要的。一种解决的方法是设计几对引物，它们的 T_m 值均相同。当然，也可以只设计一条你认为最好的引物，使用一种低严谨度的方法，如降低杂交温度。虽然第一种方法减少了参与完全配对的引物的浓度，而第二种方法可能带来非特异性的配对，但是靶序列得到了扩增，虽然会产生假阳性，但在以后的序列分析中可以被剔除。在低严谨度的情况下，引物的所有碱基并非都与模板互相配对。低温时很容易形成错配及单个碱基与模板非氢键结合，但是这并不影响引物退火和随后延伸反应的进行。不过如果错配有可能发生，最好将反应最初几轮循环的退火温度比原来的降低 5～10℃。这一策略可以使在大量错配存在时，引物也可以稳定地与模板结合并延伸，从而使 PCR 成功地进行。

19.5.1 基本标准

以下是合成 PCR 引物时需要注意的几点。但是要谨记，不论在设计引物时考虑得多么周全，只有在反应中得到验证起作用的引物才是真正好的引物。

① 通常引物与模板碱基配对的区域长 20～25 个碱基。可以使用更长的引物，但是随着长度的增加，引物的热动力学行为就更加难以预测。如果使用更短的引物，则可能产生非特异性退火，这是由于随着引物的变短，特异性减小了。在一定程度上，引物的最小长度是物种特异性的。确定引物的最小长度而同时又能保证引物的特异性，可以采用以下一个指数规则：

$$4^X > Y$$

式中 4——组成引物的核苷酸种类的数量；

X——引物的长度；

Y——需设计引物的物种的基因组大小。

例如，人类的基因组二倍体大约有 6.6×10^9 bp（大约等于每个细胞 6pg DNA）。因此，$4^X > 6.6\times10^9$，解得 X 从理论上为 17 个碱基长度的引物，即寡聚 17 核苷酸就可以扩增靶序列得到唯一的 DNA 序列，并可以避免其他无关序列的干扰。但是，毕竟 6.6×10^9 bp 的序列是很多的。实际上，寡聚 17 核苷酸仍然处于灰色区域，可能产生灵敏度的问题。因此，最好设计更长一些的引物。

② 在 PCR 中，引物之间的 T_m 值相配，比长度和序列的相符要重要得多。T_m 值的少许变化，尤其是针对较短的引物，可能会严重影响反应产物的特异性和产量。

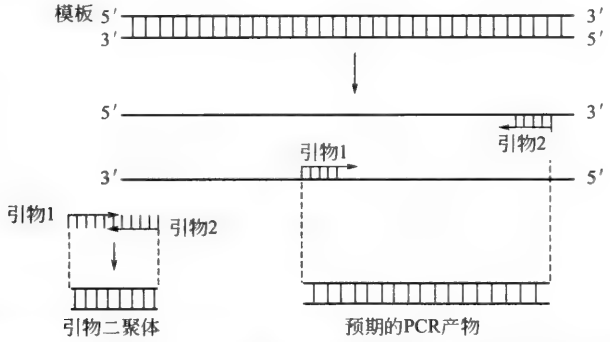
③ 3′末端的错配将是致命的。3′末端最后一个核苷酸及倒数第二个核苷酸的错配将使引物延伸不能顺利进行。聚合酶需要与模板完全配对的 3′-羟基作为添加核苷酸的底物。如果设计引物时有误，通常无法得知其 3′末端是否与模板配对，这时最好选择基因的其他位置作为靶，通常只需向原来引物靶向位点的 5′或 3′挪动几个碱基即可。

④ 如果研究人员想在 PCR 产物一端或两端添加新的序列，就可以在引物 5′端的外侧带一段突出的序列。外加的序列通常为 DNA 测序引物、RNA 转录启动子、限制性酶切位点，以及一些用于 PCR 产物的识别和下一步扩增时所用的序列，如竞争 PCR（见第 20 章）。

⑤ 每个引物的序列都应检查是否有反向重复带来的分子内互补现象。如果有这种现象，引物将产生自身的碱基配对。引物形成发夹结构使游离引物的浓度显著降低，从而极大地降低了产物量。这并不仅仅是识别的问题。由于寡核苷酸的杂交是十分迅速的，引物将优先与空间距离最近的互补序列进行碱基配对。如果引物的 5′末端与 3′末端互补，它们之间的杂交就会发生；问题的严重程度取决于退火温度的高低。同时分子内的碱基配对可导致正确模板上的错误位置发生非特异性的碱基配对。这就使部分引物的 5′末端和 3′末端多出了一些游离的核苷酸。这样会引发“PCR 引起的插入”并产生不同的产物。幸运的是，网上提供了很多免费的软件可以帮助分析引物的序列。最简单的方法就是到某个搜索引擎搜索免费的引物鉴定工具。输入“引物分析”或其他相关的关键词，就可以找到很多网站，它们提供引物 T_m 值计算、分子量、发夹形成倾向、引物间相互作用可能性等的服务。有趣的是，用相同的引物序列，在不同网站上分析的结果不尽相同。最好的验证方法就是看设计的引物能否在热循环仪中工作。

⑥ 每对引物在合成前，都应检查它们 3′末端附近的序列之间有没有互补。引物之间碱

基配对将生成引物二聚体，这就使预期的 PCR 产物量大大减少。如下所示：



当引物的 3′末端富含 GC 时，引物二聚体最易形成。如果经过检查能够形成引物二聚体，那么改变一个或两个引物 1～2 个核苷酸的长度，就可以解决这一问题。

⑦ 设计引物时（G+C）含量应在平均范围内。例如，人类基因组的（G+C）含量大致为 41%。在本实验室，所设计引物的平均（G+C）含量为 40%～50%。这一参数是很重要的，因为鸟苷和胞苷配对形成 3 个氢键，而腺苷和胸苷之间只有 2 个氢键。两条引物的（G+C）含量均在平均范围内，就可以避免其中一条引物比另一条引物与模板更有效地结合。

⑧ 设计引物时应平均分配各种核苷酸。不要不成比例地在引物的一端集中多个鸟苷或胞苷，而在另一端集中多个腺苷或胸苷。这样可以避免引物与模板退火时，其一端与模板碱基配对的效率与另一端的产生很大差异。

⑨ 避免使用重复序列。例如，5′ATG ATG ATG ATG ATG ATG，将产生特异性问题。

⑩ 引物 3′末端的最后 5 个核苷酸中，鸟苷和胞苷的数目不要超过 2 个。

⑪ 引物 3′末端有一个鸟苷或胞苷通常可以提高 PCR 的反应效率。

19.5.2　T_m 值

每个引物的单独特征是十分重要的，而多个引物在反应管中的共同作用也是同等重要的。设计引物最重要的一点，就是要在模板的特异性、引物与模板碱基配对时的热动力稳定性及两条引物共同作用进行 RT-PCR 反应的能力之间达到适当的平衡。一条引物在与其他引物协作时的行为可以用它的 T_m 值来描述。T_m 值是指引物与模板 50%发生了退火，而 50%还未退火时的温度。因此，T_m 值是引物与模板碱基配对时，引物与模板结合与解离的平衡温度。

T_m 值与引物的长度、碱基组成及溶液中钠离子（Na^+）浓度有关。一种快速计算引物 T_m 值的方法，就是每个腺嘌呤和胸腺嘧啶乘以 2℃，每个鸟嘌呤和胞嘧啶乘以 4℃。

$$T_m = 2℃(A+T) + 4℃(G+C)$$

这种方法仅适用于寡聚 11～28 核苷酸的引物。当计算所得的温度超过 68℃，这种算法就不适用了。这种方法广泛用于估算引物对中每一条引物的 T_m 值。如果引物是公司合成的，通常就会提供氯化钠浓度分别为 1mol/L 和 50mmol/L 时的 T_m 值。这就使研究人员能够在 PCR 中灵活地使用，并且可以将这些引物作为筛选文库及 Southern 印迹等类似实验的杂交探针。设计引物时，最好依据引物的 T_m 值而不是长度进行搭配。设计的引物在正式送

出合成之前，应按照上述所述的原则，对引物的序列进行全面检测，以预测它们可能的行为。

T_m 值是一个退火平衡点，但是很显然，更希望引物与模板完全配对，而非仅仅 50%配对。因此，了解了每个引物的 T_m 值，就可以计算出 PCR 循环中第二步的退火温度（T_a）。要想使引物退火的特异性最高，就可以设定退火温度比 T_m 值低几度，如 $T_a = T_m - 5℃$。如果比 T_m 值低 5℃不能产生正确的产物，则可以将退火温度设为 $T_m - 10℃$ 重新进行实验。如果引物与模板之间存在一个或多个错配，就要大大降低退火温度。虽然低温下可以忍受错配的发生，要牢牢记住，退火温度越低，非特异性引物也越多。

19.6 优化程序

目前 PCR 技术已经像一套微量移液器那样被普遍应用于分子生物学的实验中。毫无疑问，PCR 技术使细胞生物学问题的解决方法和遵循的原则得到了很大的改进。PCR 的广泛应用来源于其很好的重复性。但是，这是与反应的优化紧密相关的。当使用一对新的引物时，就需要对反应的过程进行优化。

PCR 过程中存在很多潜在的困难，有些是显而易见的，而有些却是隐藏的问题。下面将列出其中的一些注意事项。简单地讲，PCR 的效率和特异性与参加反应的每个成分都有关。

① 总混合物。样品准备的标准方法是，除一种反应组分以外的所有扩增所需的组分，事先在一个大的反应管中混合。然后将这种总混合物分装于每个反应管中，再加入剩余的一种反应组分。总混合物的使用消除了吸取溶液过程中引起的误差，从而减小了管与管之间的差异。典型的 PCR 反应体系包括 10mmol/L Tris-Cl，pH 8.3（20℃）；1.5mmol/L $MgCl_2$；50mmol/L KCl；200μmol/L dNTP；0.5μmol/L 的每种引物；每 100μl 体系加入 2.5U *Taq* 聚合酶和 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝数（<1μg）的模板。每个组分都是可以变化的，但这里列出的参数是最适的起始量。

② 二价阳离子。在使用没有加 $MgCl_2$ 的 10×PCR 反应液时，应注意一定要外加一定浓度的镁离子。大量二价镁离子与 dNTP 和模板（磷酸二酯键骨架上的负电荷）结合，从而大大提高了反应的效率和特异性。

③ 模板的质量。PCR 扩增的是位于引物之间的 DNA 片段。因此，与分子生物学的其他经典方法相比，PCR 方法对部分降解的 DNA 和 RNA 模板并不敏感。但是降解严重的模板也是不能够扩增的，所以在 PCR 进行前，最好电泳检测一下模板的质量。

④ 引物。PCR 所需的引物终浓度一般为 0.1～1.0μmol/L，使用更高浓度的引物将使所得的产物量急剧减少。如果新合成的引物在退火温度接近 T_m 值的情况下没有产物生成，那么就降低退火温度再进行反应；如果这样仍旧不能反应，则应马上放弃这对引物，重新选择引物序列。引物合成的定购没有量的限制，合成的引物是以冻干的状态运输的。第一次使用时，要加入灭菌水或 TE 溶液（10mmol/L Tris，pH 8.0；0.1mmol/L EDTA）进行溶解。然后，通过紫外吸收值确定各个引物的浓度。千万不要相信管子上或产品报告单上所列的引物量是准确的。通过实验准确确定引物的浓度是进行对称性 PCR 的关键。使用非等量的上游引物和下游引物将导致错误产物的合成。

关于引物的纯度，自然是引物的纯度越高，反应的效率和特异性就越好。引物最基本的

纯化就是合成过程中保护基的去除。总是有末端缺失的引物分子会影响全长分子，这些分子可能会对产物的生成产生严重的影响。厂商提供的引物纯化方法有几个等级，因此，虽然在合成引物的费用当中包括了某些纯化方法的费用，但是要想得到更好的纯化引物，就需要支付额外的费用。常用的引物纯化方法有：脱盐，柱纯化，反相高压液相色谱（HPLC），聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）及凝胶过滤。

a. 脱盐的费用通常包括在引物合成的费用中。脱盐的目的是除去残留的化学物质或有机物。它们来自引物合成的过程中，如脱离合成柱、去除保护基团等。对于小于 35 个碱基的引物，脱盐处理就可以满足 PCR 的要求。对于大于 35 个碱基的引物，或者对引物的纯度有更高要求时，就需要进一步的纯化。

b. 柱纯化是一种快速的方法，其所得的引物纯度与 HPLC 纯化的相近。这种方法的原理是全长引物在 5′末端有 DMT 基团（二甲氧三苯甲基），而末端短缺的引物分子没有这一基团，因此它们之间的疏水性不同。柱纯化适用于大于 50 个碱基的引物的纯化。用柱纯化或 HPLC 纯化的引物，可以提高定量分析、克隆及位点特异性突变反应的效率。

c. 通过反相 HPLC 纯化的引物纯度通常可以超过 95%。纯化的原理与柱纯化的相同。HPLC 可以用于纯化大量（如大于 1μmol）的引物，但是不适用于大于 50 个碱基的引物。由于增加了纯化的步骤，定购 HPLC 纯化的引物，厂商需要额外的 1～2 天时间才能出货。

d. PAGE 纯化是终极的纯化方法。使用这种方法纯化的引物纯度一般可以达到 99%。由于聚丙烯酰胺凝胶可以区分无论是长度还是序列的单一碱基差异的分子，长度在 50～100 个碱基之间的引物均可以使用这种方法进行纯化。因为要从凝胶中回收引物，所以 PAGE 纯化得到的引物量比较少。这种方法也需要额外的 1～2 天时间。

e. 凝胶过滤的方法，由于去除了合成引物及纯化过程中存在的痕量化学物质，消除了可能的细胞毒性，当寡核苷酸计划用于与细胞有关的体内实验或反义检测等实验时，强力推荐这种纯化方法。这一方法可以单独使用也可以结合以上几种方法共同使用。单独使用时，凝胶过滤可以除去引物中的无机盐类、反应残余的化学物质和极短的末端缺失序列，之后就可以将引物冻干，重新溶解在适合的缓冲液中并定量。

⑤ 反应组分。用旧的模板和新的 PCR 试剂盒前，应该测试一下其中的组分。许多 PCR 试剂盒都含有供测试的模板和引物，可用来验证反应体系是否有作用。存在问题的反应组分与引物设计有误及降解的模板一样，都可能使反应不能产生产物。此外，以下几种物质都可以抑制 PCR 的进行：苯酚、氯仿、硫氰酸胍、十二烷基硫酸钠（SDS）、*N*-十二烷基肌氨酸钠、腐殖酸、乙醇、溴酚蓝、EDTA 及矿物油。

⑥ 样品准备区。最好有足够大的实验室空间使模板的准备、反应体系的准备及 PCR 循环区域分开在不同的房间，但在小型的实验室里是难以实现的。因此，为了减小污染发生的危险（PCR 的遗留物），最好在实验室至少为模板的准备、试剂准备和 PCR 循环划出特定的区域。并且研究者还必须十分注意哪些管子是可以移动到哪些区域以及移动的方向。通常应该设计四个区域，分别进行样品的准备、反应及结果的分析。样品的移动也应该从最清洁或纯度最高的区域（反应体系准备区）到纯度较低的区域（模板准备区）最后再到纯度最低最脏的区域（热循环仪的放置区域和凝胶电泳分析区域）。

按图 19.3 所示的流程，单方向移动 PCR 样品可以减小污染的发生。研究人员必须注意一些实验设备，如微量离心机、微量移液器，甚至是实验服都不应该随便移动位置。不管是 DNA 还是 RNA 作为模板，在 PCR 中若不注意这些问题，就可能由于污染而影响最终的实

验结果。

⑦ 阳性对照。由于阳性对照可能会污染反应储备液，并对下游的各种反应产生极大的影响，因此应尽量减少阳性对照的数量。阳性对照的结果最好与反应产物的大小不同，这样如果阳性对照的模板污染了储备液或其他反应组分，则通过观察电泳的结果是否有分开的两条带就可以判断了。

⑧ 阴性对照。每一个反应和电泳时，都应至少有一个阴性对照。阴性对照的选取要根据实验所需。

⑨ 气溶胶的污染。为了防止微量移液器引起的污染，应尽量使用容积式枪头（positive displacement micropipette tips）（图 19.4）。当然也可以使用带滤芯的枪头防止气溶胶的污染。带有模板的气溶胶很容易进入反应储备液中，而一些非预期的反应产物的产生可能就是由于使用了已经污染了的溶液和微量移液器造成的。因此应经常注意正确地吸取溶液。

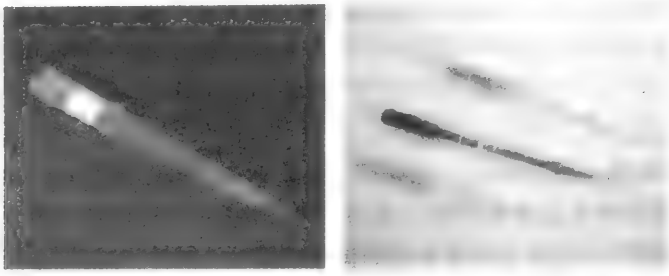


图 19.4 PCR 使用的枪头。(a) 标准的带滤芯的枪头 (Rainin)，防止枪头里的气溶胶污染微量移液器。(b) 容积式枪头 (Tri-Continent Scientific)。这种微量注射器式的枪头可以防止气溶胶的形成。不管使用何种方法，减小气溶胶的形成是必需的。否则微量移液器的污染将造成大面积的污染发生

⑩ 热循环仪。PCR 的优化和下一步实验的进行，都应该在同一台热循环仪中进行。由于在不同的仪器中反应的效率差别很大，在旧的仪器上优化了的反应，在新的仪器上可能会产生完全不同的 PCR 产物。事实上，这一新的条带可能在使用旧的仪器时也是存在的，但是量比较低，电泳时观察不到。如果发现所有的反应突然都不能进行了，应检查一下是否其他人无意中改变了事先设定的 PCR 程序；对已经优化好的循环参数进行修改对反应是不利的。

⑪ 循环参数的设定。除了一些特殊的反应，包括长距离 PCR，循环的每一步（热变性、退火、延伸）的时间都应该尽可能短。新式的热循环仪在不同的温度间变化很快，短的循环有利于反应的高重复性。如果反应的退火温度高于 65℃，使用两个温度的循环比通常的三步循环法更好。把温度设定在 68～72℃之间，这样就可以把退火和延伸组合成一步。例如，热循环的程序可以设定为：

起始模板的解链	94℃	2min	
变性	94℃	15s	30 个循环
退火/延伸	94℃ (70℃)	15s	
保存	4℃	∞	

这可能是因为，与短引物比较，具有较高 T_m 值的长引物与模板的作用更快。另外，通常在 PCR 中所用的热稳定酶在 68～72℃之间的聚合酶活性最高。

⑫ 尿嘧啶 N 糖苷酶 (UNG)。这种酶可以成功地抑制有遗留污染的模板。简单地讲，PCR 反应体系中含有 dUTP，可以作为 dTTP 的类似物。扩增出的 PCR 产物中含有尿嘧啶

而不是胸腺嘧啶是很正常的。在扩增前，UNG 就可以将以前反应中生成的含有尿嘧啶的遗留模板切断。新的含有胸腺嘧啶的模板不是 UNG 的底物，因此不会受到这个酶的影响。dUTP 的存在对 PCR 的特异性和效率没有影响，而 UNG 在下一步的热变性中会被破坏。

⑬ 热启动 PCR。PCR 是在室温或冰上准备好，然后升温到 94℃起始循环的，因此反应体系在升温到 94℃的过程中一定会经过 72℃。由于 72℃是引物延伸（至少对 *Taq* 聚合酶而言）的最适温度，即使引物与模板上的某些位置不完全配对（这些位置在严谨条件下不会产生配对），也会有非特异性的 PCR 产物生成。为了防止这种情况的发生，采用了许多策略来抑制在第一轮循环开始前产物的合成，这时引物和模板都未完全变性。以往所用的方法有使用抗体来抑制聚合酶的活性直到抗体发生热变性，例如 TaqStart 抗体（Clontech）和 JumpStart Taq(Sigma)。其他方法有使用蜡将反应组分分开，例如使用 AmpliWax（Perkin Elmer），直到加热使蜡熔化，反应组分混合从而使 PCR 开始进行。现在许多公司都有它们自己的热启动方法，大多数是以抗体为基础的。另外，可以将一种重要的反应组分预热到 75℃再加入到反应体系当中去。虽然这种方法看似经济实用，但是并非热启动反应的好方法。研究人员可能会因为触摸到热循环仪上加热块或热的反应管而被烫伤。许多研究人员都愿意选用热稳定酶或混有抗体的热稳定酶。这种抗体可以在模板完全变性前抑制聚合酶的活性。热启动技术的应用对于任何以 RT-PCR 为基础的实验都是十分重要的，并且是使用“困难模板”进行反应成功的关键。

⑭ 酶的混合物。在典型的 cDNA 合成过程中，遇到的许多传统问题延续到了 RT-PCR 的领域。目前盛行的一种解决方法，就是将不同热稳定酶进行混合，即成为酶的混合物。酶的混合物在合成基因组全长的 PCR 产物时获得了巨大的成功。这种被称为长距离 PCR 的方法，在设计之初就是为了扩增出基因组全长的 PCR 产物，一般为大于 4kb。本实验室经常使用这种非常有效的技术，来扩增那些极低表达量的 mRNA、细胞质中较长的 mRNA 和更长的未剪接的核不均一 RNA（hnRNA）的 cDNA。典型的酶混合物包括 *Taq* 聚合酶和其他的热稳定酶，如 *Pwo*。*Taq* 聚合酶具有高效的 5′→3′聚合酶活性（前行活性），但是这种酶在 95℃的半衰期大约是 40min，而且也没有 3′→5′核酸外切酶活性（校对活性）。因此，如果 *Taq* 聚合酶或其他没有校对活性的酶出现了错误，那么这个错误将稳定地掺入到 PCR 产物中去。另一些热稳定酶，如来自于球菌（*Pyrococcus*）的酶，具有很强的热稳定性并且有校对能力。*Taq* 聚合酶与其中的一种酶混合于经修饰的缓冲液（通常为铵盐缓冲液）中，共同作用比单独使用任何一种酶都能获得更高的效率和扩增的保真度。此外，当循环数超过 30 达到 35 或 40 循环时，*Taq* 聚合酶已经被耗尽，由于第二种酶或多或少地接替了其位置，因此这时 PCR 产物仍可以积累。这种方法尤其适用于检测丰度极低的转录产物。表 19.6 中列出了常用的 PCR 酶的热稳定性。大部分公司都有各种酶的混合物出售。

表 19.6　PCR 中所选用的酶的热稳定性

酶	来源物种	半衰期	校对活性
Taq	*Thermus aquaticus*	95℃ 40min	没有
Tfl	*Thermus flavus*	95℃ 40min	没有
Tth	*Thermus thermophilus*	95℃ 20min	没有
Tli	*Thermococcus litoralis*	100℃ 2h	有
Pfu	*Pyrococcus furiosus*	100℃ 2h	有
Pwo	*Pyrococcus woesei*	100℃ 2h	有
Deep Vent$_R$	*Pyrococcus* GB-D	95℃ 23h	有
Vent	*Thermococcus litoralis*	95℃ 6.7h	有
Stoffel fragment	*Thermus aquaticus*	95℃ 80min	没有

⑮ 优化试剂盒。可以购买某些商业化的试剂盒，这些试剂盒通常包括已知的可以增强 PCR 的化合物。例如 Sigma No. OPT2，这一系统含有一些 10×缓冲液和 7 种已知的可以增强 PCR 的辅助物：大肠杆菌单链结合蛋白（Chou，1992）、甲酰胺（Sarkar 等，1990）、硫酸铵（Olive 等，1989）、牛血清白蛋白（BSA）（Paabo 等，1988）、二甲基亚砜（Winship，1989；Cheng 等，1994）、甜菜碱（Rees 等，1993；Henke 等，1997）、甘油（Cheng 等，1994）。表 19.7 总结了这些辅助物对 PCR 的影响。要对特定的模板和引物进行优化，首先就要选择一种最合适的 10×缓冲液，使能得到足够量的产物而没有非特异产物的生成，然后再每次加入一种辅助物对反应进行修饰。看新使用的反应条件是否是节省时间和金钱的最佳策略。

表 19.7 辅助物对 PCR 的增强作用

PCR 辅助物	工作浓度	作　用
硫酸铵	15～30mmol/L	影响模板和引物的变性和退火
甜菜碱	0.8～1.6mol/L	减少富含 GC 区域 二级结构的形成
牛血清白蛋白(BSA)(非乙酰化的形式)	10～100μg/ml	稳定 *Taq* 酶和其他种类的酶
二甲基亚砜(DMSO)	1.0%～10.0%	减少模板脱嘌呤化，有利于双链的解离
甲酰胺	1.25%～10.0%	增加富含 GC 的模板的特异性
甘油	15%～20%	增强 *Taq* 酶的稳定性，降低模板的 T_m 值
大肠杆菌单链结合蛋白(SSBP)	0.7～1.5μg/反应	加速引物的退火，抑制错配引物的延伸

⑯ 避免使用矿物油覆盖在反应体系上。矿物油不仅很脏，而且它将极大地降低反应活性和重复性。因此在进行 PCR 时，最好使用带热盖的热循环仪，尽量避免使用矿物油。

19.7 PCR 产物的分析

由于琼脂糖凝胶制备很方便，而且 1%～3%的凝胶适用于快速分析任何长度的 PCR 产物，因此分析 PCR 产物通常选用琼脂糖凝胶电泳的方法。这种凝胶经熔化并冷却到大约 55℃后，可以在凝胶溶液中加入溴化乙锭。另外，凝胶也可以在电泳后使用 SYBR 金染色，灵敏度将更高。

大多数公司都有各种琼脂糖出售，可供选择的有标准的琼脂糖或低熔点的琼脂糖，还有各种等级的琼脂糖，可专门用于分离低分子量 PCR 产物等。在本实验室，通常使用 SeaKem GTG（Cambrex），用 1×Tris-乙酸盐-EDTA(TAE) 配制成 2.5%～3.0%的溶液。这种浓度的琼脂糖凝胶可以用于检测 200～1000bp 的 PCR 产物。用微波炉加热高浓度的琼脂糖凝胶时要十分注意，因为不管是在微波炉里正在加热的，还是刚加热好的凝胶，都特别容易沸腾。为了减少过沸腾，加热前最好将琼脂糖加入 TAE 缓冲液中放置 5～10min。这样可以使琼脂糖颗粒吸水膨胀，然后再小心地将琼脂糖加热煮沸。当制备高浓度的凝胶时，要特别小心防止沸腾的凝胶溅出造成伤害，并且避免在烧瓶或广口瓶中煮沸大量的凝胶，在使用电炉加热时应尤其注意。

19.8 RT-PCR 质量监控点

当准备使用某核酸样品进行 PCR 时，经常会遇到的最大问题就是模板的完整性，这一问题在使用 RNA 作为模板时就出现了特别的意义。对于那些研究基因表达的实验室来说，通

过 PCR 技术扩增某个转录产物所使用的引物和参数都是很久以前就进行优化了的[1]。使用新准备的 RNA 样品或以前曾经可行的 RNA 样品进行实验而未能得到产物，这是十分令人头疼的事情。则需要结合上文所述的优化策略注意以下几点。

① 使用前，电泳检测 RNA 的质量。小型的凝胶电泳就可以清楚地显示出 18S 和 28S 核糖体 RNA（rRNA）。在水溶液中而不是在乙醇沉淀中保存的 RNA 降解非常迅速。当样品多次反复冻融时，这种情况将急剧恶化。在本实验室，以前纯化的 RNA 在 65℃加热 5min，然后进行小型凝胶电泳（1.2%琼脂糖，1×TAE 中；非变性）；这一步的目的是验证 RNA 的完整性（无需杂交）。如果 18S rRNA 和 28S rRNA 条带的亮度相当，就可以放心地使用了。

② 在反应体系中只加入一对引物，但不加模板，进行检测。这一步可以确定反应储备液是否被污染，以及是否有引物二聚体的生成。

③ 在反应体系中只加入模板和一条引物进行检测。这是确定引物不会发生自身引导，并且是检测引物配对特异性的唯一方法。图 19.5 显示了对新合成的一对引物进行这一质量监控实验的精确结果。

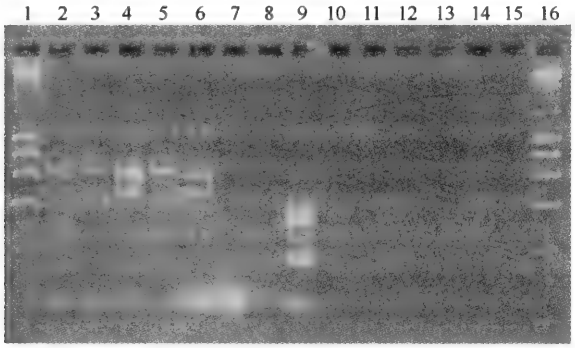


图 19.5　引物自身引导的检测。对两条新合成的引物分别测定它们的自身引导作用。第 2～6 泳道：将 100ng 的来自于五个不同样品的第一链 cDNA 加入到只有 5′引物的 PCR 反应体系中。第 10～14 泳道：将 100ng 的同样来自于五个不同样品的第一链 cDNA 加入到只有 3′引物的 PCR 反应体系中。第 7 泳道和第 15 泳道为阴性对照（未加引物），第 8 泳道为空白，第 9 泳道为阳性对照，第 1 泳道和第 16 泳道为 PCR 的分子量标准。在只有 5′引物的反应体系中产生了大量的 PCR 产物，说明 5′引物具有自身引导的作用，因此 5′引物需要重新设计

④ 进行第一链合成反应时，在反应体系中不加反转录酶来检测每一种 RNA 样品。然后，使用管中的样品作为模板进行 PCR。这一样品被称为“无 RT 对照”或“RT-减”对照，它应该没有产物的生成。当 RNA 样品中没有反转录酶时，并且确定在吸取溶液时没有带入污染，如果这时有条带产生，那么就一定是 RNA 样品中含有基因组 DNA 的污染。大多数实验室在进行 RT-PCR 时，在分离出 RNA 样品时就进行 DNase 处理（附录 5），然后再进行 RT^- 对照实验。

⑤ 用并非有直接实验目的的引物去检测难以检测的 RNA。从特定生物材料中分离得到的完整的纯 RNA，都可以通过反应产生 PCR 产物。这可以通过使用常用的引物，如 β-肌动

[1] 与 RT-PCR 相关的技术将在第 20～22 章作详细的介绍。

蛋白、组蛋白或 GAPDH，来确定有问题的 RNA 样品是否可以用来扩增出产物。如果对照引物的 PCR 产物非常明显，而实验引物未能产生 PCR 产物，那原因就比较好分析了。没有信号就意味着没有转录产物，或者 RNA 样品量太少，不能产生扩增反应。后一种情况可以通过使用对照引物进行扩增来排除。

⑥ 确认不正常的条带是否为不对称扩增的产物。电泳检测时可能出现非预期的条带，其长度大约为预期产物的一半。这通常是由于一条链的优先扩增造成的。这种情况的发生，就是由于一种引物的物质的量超过了另一种引物，并且事实上这种情况经常发生。这一问题非常容易解决。只要重新用分光光度计检查一下引物的浓度。在随后的实验中，使用稀释为相同浓度的引物就可以了。这样，由于上述原因产生的不正常的条带就会消失。

⑦ 明智地选择阳性对照模板。阳性对照的产物必须很容易地与实验样品的产物明显分开。如果阳性对照污染了反应的储备液，实验室的所有工作都将停止。

19.9 相关技术

19.9.1 cDNA 5′末端快速扩增 PCR

传统 cDNA 合成方法的一大关键障碍，就是未能得到对应于 mRNA 5′末端序列的 cDNA分子。产生这种问题的部分原因，是以前合成 cDNA 第一链时的反转录过程和 PCR 引物设计原理的限制。缺失了 5′末端序列，就不能克隆出全长序列或者确定出转录起始位点（TSS）的准确位置。于是发展出了一种被称为 RACE（cDNA 末端快速扩增）的方法（Frohman 等，1988），主要用于当只知道转录产物的部分序列时克隆其 5′末端（5′RACE）、3′末端（3′RACE）及全长 cDNA 分子的序列。

5′RACE 有两种策略。较老的方法同样包括使用下游引物进行 cDNA 第一链的合成，所用的引物可以是 oligo(dT)，也可以是与转录产物 5′末端区域配对的基因特异性引物。引物的 3′末端一定要有游离的羟基才能起始反转录反应的进行。然后由一种特定的末端脱氧核糖核苷酸转移酶给新合成的 cDNA 第一链加尾，即在酶作用下在 cDNA 的 3′末端加上已知的核苷酸。末端脱氧核糖核苷酸转移酶通常被称为“末端转移酶”，它能够在 DNA 单链、平头双链或 3′凸出双链的 3′末端以非模板依赖方式加上核苷酸，如图 19.6 所示。以这种方式加上的核苷酸被称为锚定序列[1]。添加一种类型的核苷酸通常被称为同聚物加尾反应；因此，poly(G) 的锚定序列可以与 poly(C) 的锚定引物（作为上游引物）退火来进行 PCR。

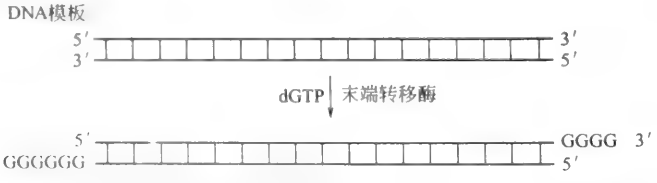


图 19.6 末端脱氧核糖核苷酸转移酶的作用。这种特殊的酶也被称为末端转移酶，能够以非模板依赖的方式在平端的或凸出的 DNA 3′末端加上核苷酸。这种活性应用于许多 PCR 和克隆的方法

[1] 以前这种方法也被称为锚定 PCR（Loh 等，1989）或单向 PCR。

同样，poly(A) 的锚定序列可以与 poly(T) 的锚定引物退火。使用这种方法，PCR 扩增就只需要一条而不是两条基因特异性的引物（作为下游引物）。但是，这一方法最主要的局限性就是任何通过反转录反应生成的 cDNA 第一链都可以作为同聚物加尾反应的底物，即使是反转录不完全 5′末端缺失的 cDNA 也可以参加反应。因此，根据下游引物位置的不同，经常会出现大量的假阳性现象。

克隆转录产物 5′末端的新的更好的方法就是 RNA 连接酶介导的 RACE（RLM-RACE）(Maruyama 和 Sugano，1994；Shaefer，1995)。这种方法彻底解决了上述问题，只能检测到拥有完整 5′末端的 cDNA 分子，末端缺失的 cDNA 及部分降解的转录产物延伸得到的 cDNA都没有作用。简要地讲，这种方法就是在反转录前只在全长未降解的 mRNA 的 5′末端通过 T4 RNA 连接酶加上一段已知序列的寡聚 RNA。

RLM-RACE 过程在图 19.7 中列出。经过电泳检测确认 RNA 样品的质量很高后，在 RNA 样品中加入牛碱性磷酸酯酶（calf intestinal phosphatase，CIP）去除暴露在外的 5′-磷酸基团。CIP 的作用不影响 5′帽子结构，因此那些已经去掉了 5′末端的帽子结构和部分降解了的 mRNA 分子就发生了去磷酸化反应。结果那些已被破坏了的非全长的转录产物的 5′末

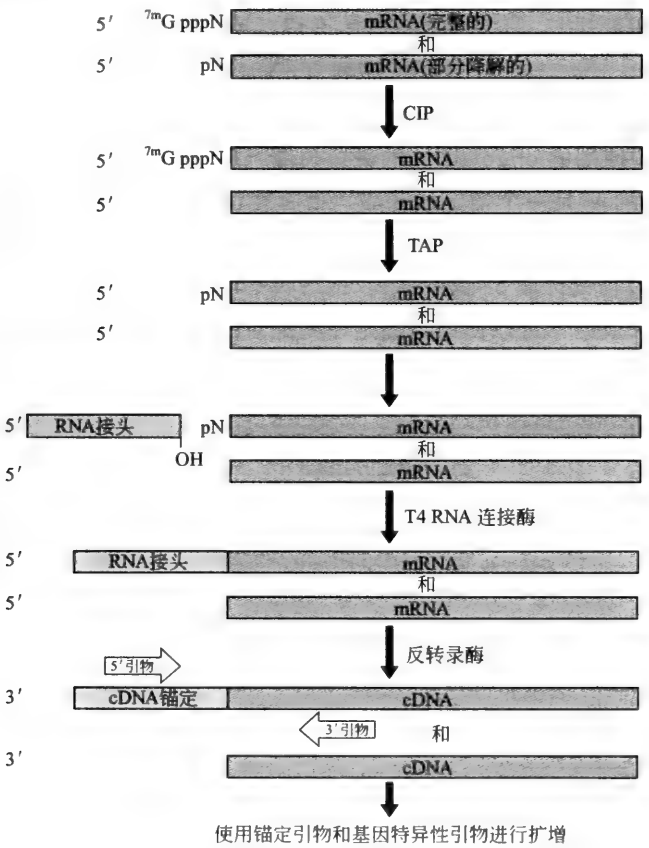


图 19.7　RLM-RACE 过程。这一反应原理适用于带 5′帽子的完整 mRNA 分子的克隆。这种方法的新颖之处，在于在反转录前，用牛碱性磷酸酯酶（CIP）脱去部分降解 mRNA 5′-磷酸；用烟草酸焦磷酸酶（TAP）脱去全长 mRNA 的帽子，露出连接反应所需的 5′-磷酸基团；然后再与 RNA 接头进行连接。非 mRNA、断裂的 mRNA 和反转录延伸未能到达 RNA 接头的 cDNA 第一链分子都不能扩增。RLM-RACE 是检测转录起始位点非常有效的工具

端就变为了羟基。此后，烟草酸焦磷酸酶（tobacco acid pyrophosphatase，TAP）的作用从5′帽子上除去带有 α 磷和 β 磷的 ^{m}G 核苷。这时只有全长 mRNA 的 5′末端有一个磷酸基团可以作为 T4 RNA 连接酶的底物。然后在脱掉帽子的 mRNA 上连接上一个 RNA 锚定序列（作为接头）。部分降解的和在反应开始时就已经脱掉帽子的分子不能参加反应，因为这些分子的 5′末端为羟基而不是磷酸基团。连接有锚定序列的 RNA 就可以进行反转录反应。虽然所有的 RNA 分子都可以与下游引物退火进行反转录反应，但是，只有能与锚定序列特异性的上游引物配对的 cDNA 才能够扩增出产物。RLM-RACE 方法还有一个优点，就是可以使用巢式锚定引物。这一引物的设计可以严格遵循平均分配碱基种类、(G+C) 含量的平均化这些引物设计的基本原则。而同聚加尾的 cDNA 锚定引物的 (G+C) 含量，要么是 100%，要么是 0%。在本实验室最近的研究当中，使用 RLM-RACE 方法在一个基因座中发现了众多的转录起始位点（Bassett 等，2004）。

19.9.2 cDNA 3′末端快速扩增 PCR

转录产物的 3′末端序列的克隆（3′RACE）通常没有 5′RACE 那么困难。3′RACE 的标准方法是使用下游引物进行 mRNA 第一链的合成，所用引物的一般结构如下：

5′-锚定序列-T_{11}V-OH 3′

① 锚定序列是位于 oligo(dT) 5′端的一段特定的序列。

② T_{11}是反应中使用的 oligo(dT) 的最短长度（可以增加长度）。

③ 引物 3′末端的 V 是一个锚定核苷酸，指腺苷、胞苷或鸟苷（见表 19.5）。

这一结构就能够将引物引导到 poly(A) 尾的 5′端，从而能够反转录到 mRNA 的编码区。也可以将下游引物设计成 5′-锚定序列-T_{11}VN-OH 3′，在 3′末端有两个锚定核苷酸以增加稳定性。cDNA 合成后，可以使用与锚定序列配对的锚定引物（作为下游引物）和基因特异性引物（作为上游引物）进行 cDNA 的扩增（如图 19.8）。虽然也可以使用 oligo(dT) 作

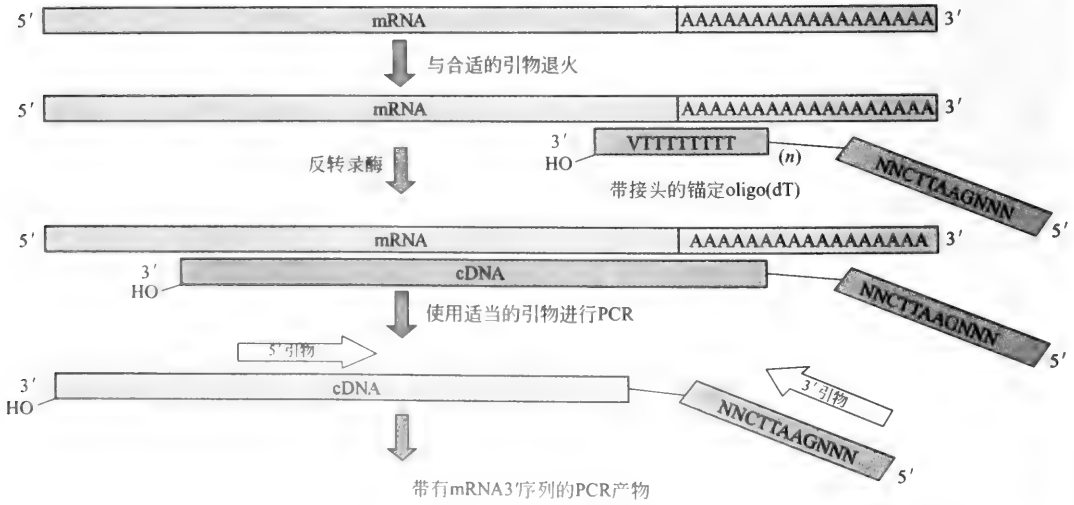


图 19.8　3′RACE。通常使用这种方法来扩增 mRNA 3′末端序列。这种方法比传统的 5′RACE 方法或 RLM-RACE 方法简单得多。使用 5′末端有一段接头的锚定 oligo(dT) 引物，可以使引物定位在 poly(A) 尾的 5′端，并且在 cDNA 第一链的 5′端加上一段新的序列，可以与特定的 3′引物退火

为 3′ RACE 的下游引物，但是根据经验，尽量不要使用富含 AT 的序列作为引物，而 oligo (dT) 的 (A+T) 含量达到了 100%。

19.9.3　巢式 PCR

通常未能产生 PCR 产物的原因，可能是由于模板的丰度极低，或者更为普遍的是模板不纯。一种解决的方法就是将反应后没有产生 PCR 产物的溶液按 1∶100 稀释到新的反应混合物中，再进行 30 轮循环。但是与简单的增加反应循环数相比，一种包括两套引物被称为巢式 PCR 的方法应用得更为广泛，并能得到更好的结果，当模板的纯度有问题时，表现尤为明显。

在巢式 PCR 方法中，两套引物中的一套引物（内部引物）被设计为与另一套引物（外部引物）的扩增区域内的序列碱基配对，这些引物的相对位置如图 19.9 所示。样品首先使用外部引物扩增 30 个循环，反应后的溶液（可以稀释）使用内部引物再进行 25～30 轮的扩增。如果引物设计得当，巢式 PCR 通常都能够得出令人满意的结果。在设计引物时，要根据前文所述的引物合成原则对四条引物进行仔细检查。

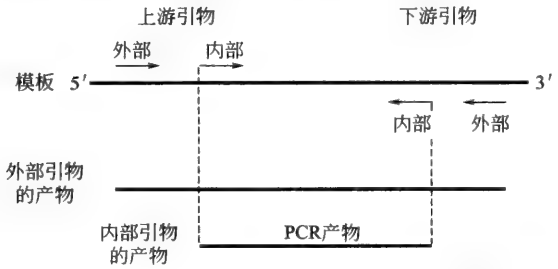


图 19.9　巢式 PCR。当 PCR 中遇到产物纯度问题时，通常需要设计两套基因特异性的引物。起初的 PCR 扩增反应使用外部引物。接着使用位于外部引物识别区域以内的内部引物和第一步反应产物的稀释溶液进行第二次扩增。这种方法减少了第一步反应中产生的非特异性产物的扩增，从而大大增强了反应的特异性

19.10　实验方案：cDNA 第一链的合成

实验前，先进行小型凝胶电泳检测 RNA 模板的质量。

① 制备总混合液 1。

组　分	每个反应❶	组　分	每个反应❶
水	5μl	oligo(dT)$_{12\sim18}$(1.0μg/μl)	1μl
dNTP(10mmol/L)	1μl	总体积	8μl
随机引物(2.0μg/μl)❷	1μl		

② 将总混合液 1 分装至每个反应管，每管 8μl。

③ 加入 2μl RNA 样品❸（50～1000ng；确保每管中加入的量都一致）。

---

❶ 如果为多个反应配制总混合液，应比所需的总混合液多配制一份，因为在吸取溶液时可能会产生微小的误差。这种标准的操作，确保有足够体积的总混合液。在准备 PCR 总混合液时也应遵循这一原则。

❷ 此外，终浓度为 1μmol/L(需加入的体积是可变的)的基因特异性引物代替 oligo(dT)和/或随机引物。

❸ 不要将 RNA 直接加入到总混合液中。将总混合液等分后再分别加入 RNA 样品。

④ 将反应管在 70℃加热 5min，RNA 变性完成后，将样品置冰上至少 2min。

⑤ 当 RNA 加热变性时（第④步），制备总混合液 2。

组　分	每　份	组　分	每　份
水	补齐	AMV 反转录酶(20U/μl)	1μl
10×第一链缓冲液❶	2μl	总体积	10μl
RNasin(20U/μl)	1μl		

⑥ 在变性的 RNA 样品管中加入总混合液 2，每管 10μl。

⑦ 25℃水浴 5min。

注意 短暂的室温水浴的目的是，①以利于模板与引物的退火；②使反转录酶获得从随机引物和/或 oligo(dT) 上延伸的机会，以便在下一步水浴温度升高时能够有更高的热稳定性。这样通常可以获得更长的 cDNA 分子。

⑧ 如果使用的是热稳定的或增强的反转录酶，50℃水浴 50min。否则，将样品在 37℃或 42℃水浴 60min。

注意 许多种类的反转录酶都可以在高温条件下进行 cDNA 第一链的合成。许多公司都有多种现货可以选择。

⑨ 将样品加热到 95℃放置 5min，破坏反转录酶。反转录酶若没有灭活，会对接下来的 PCR 过程产生持续性的影响。

⑩ 新合成的 cDNA 第一链应置冰上，这时就可以准备进行 RT-PCR 了。另外，cDNA 在使用前也可以在－20℃保存。

19.11 实验方案：PCR 反应扩增 cDNA

① 从获得许可的公司购买 PCR 试剂，用它们制备 PCR 总混合液。通常要制备 50μl 反应体系：取 5μl 10×PCR 缓冲液（无 Mg^{2+}）；3μl 25mmol/L $MgCl_2$（在优化时是可变的）；终浓度为 0.1μmol/L 的上游引物（体积可变）；终浓度为 0.1μmol/L 的下游引物（体积可变）；0.5μl *Taq* DNA 聚合酶（每个反应 1.0～2.5U）；加水至 48μl。

注意 1 如果每个反应扩增的序列不同，则不要在总混合液中加入引物，而应在每个反应管中直接加入相应的引物。如果所有样品都使用同一种 cDNA，可以直接将其加入到 PCR 总混合液中。

注意 2 不要将所有的 cDNA 都加入到总混合物中去。至少保留一些 cDNA 溶液，以后可能会使用相同的模板、不同的引物来进行 PCR。即使目前不用，将来也有可能有用。

② 将总混合液分装到一定数量的反应管中，每管 48μl。

③ 在每个反应管中加入 2μl 相应的 cDNA 第一链的产物。

④ 如使用没有热盖的热循环仪时，则在每个反应管中加入 30μl 的矿物油覆盖反应液。使用有热盖的热循环仪则无需加矿物油。

注意 使用矿物油会影响反应的重复性。

⑤ 使用以下的通用循环程序（这些参数已经在 Applied Biosystems 9700 型热循环仪上

❶ 典型的 10×第一链缓冲液：100mmol/L Tris，pH 8.3；500mmol/L KCl；40mmol/L $MgCl_2$。这一缓冲液通常随反转录酶一起提供。

优化过了。这些循环参数，在使用新引物、更换反应液的成分及热循环仪的型号时，都要重新进行优化。

起始模板的解链	94℃	2min	
循环			
变性	94℃	30s	30 轮循环
退火❶	55℃	30s	
延伸	72℃	1min	
最终的延伸	72℃	5min	
保存	4℃直到即将使用		

⑥ 取出能被总体积整除的数量的反应液（50μl 反应体系取出 5μl），在小型电泳装置上电泳检测产物的长度和种类。PCR 产物的分析如本章前文所述，通常使用配制在 1×TAE 缓冲液中的 2%～3%的琼脂糖凝胶。

19.12　PCR 产物的克隆

大多数情况下，PCR 技术扩增和再扩增 DNA 序列的能力取代了传统的载体-插入片段连接的方法。毕竟，如果想得到更多的相同产物，只需要使用相同的引物进行再 PCR 即可。克隆 PCR 产物是为了：①有利于测序；②有利于体外转录；③分离混合的 PCR 产物；④使重组蛋白得到表达。其中，测序和体外转录也可以不经克隆；使用经修饰的含有适当 5′启动子序列的上游引物和下游引物，对 PCR 产物进行重新扩增，就无需使用载体了。PCR 产物可以直接从琼脂糖凝胶或反应管中纯化出来。许多试剂盒都可以用于 PCR 产物的纯化，这些试剂盒的操作都十分简单。大致的过程如下：将目的条带从凝胶上切下来，所得胶块在异硫氰酸胍（GTC）溶液中溶化；或者直接在 PCR 后的反应管中加入异硫氰酸胍，产生一个高离液、高盐的环境。在这种条件下，PCR 产物可以与硅胶质结合（Vogelstein 和 Gillespie，1979）。然后洗掉残留的反应组分，包括引物和溶化的琼脂糖凝胶等。纯化的 DNA 可以在低盐浓度条件下，用 TE（10mmol/L Tris，pH7.5；0.1mmol/L EDTA）或水从硅胶质上洗脱下来。

如果必须进行克隆，有几种方法可供选择。*Taq* DNA 聚合酶有一非常有用的特点，就是在合成产物每条链的 3′末端各加上一个核苷酸，这个核苷酸通常为 A。这就为一种被称为 TA 克隆的简便方法提供了基础。末端带有 A 突出的 *Taq* 酶产物，可以与两条链的 3′末端都带有 T 突出的载体退火，然后进行连接反应（如图 19.10）。可以从公司购买，也可以自己制备这种载体。它应含有选择性标记（如 Amp^r、Tet^r 或 Kan^r），并可以用于蓝/白斑筛选的 *lacZ* 基因。

使用 A 加尾的产物进行克隆有如下优点。

① 使用 A 加尾的产物进行克隆，在克隆前无需知道 PCR 产物的序列。

② 使用这种产物，无需再合成带有 5′突出的限制性酶切位点或其他序列的引物。

③ PCR 产物的纯化虽然不是必需的，但是相当有益。

---

❶ 合适的退火温度（T_a）取决于所用的寡核苷酸的 T_m 值。请参考合成引物的厂商提供的引物说明页。如果不确定如何着手，就使用 $T_a = T_m - 5℃$。而且，T_m 值可以通过公式 $T_m = 2℃(A+T) + 4℃(G+C)$ 快速地估算。另外，Applied Biosystems 9700 型热循环仪具有内置的 T_m 值计算功能。

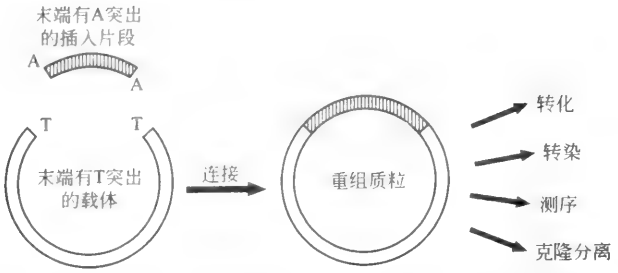


图 19.10 TA 克隆。使用 *Taq* 聚合酶扩增得到的 PCR 产物，它每条链的 3′末端都有一个核苷酸突出，一般为腺苷。这就非常有利于与末端有一个胸苷突出的线性载体进行连接。这种载体是十分常见的。总的来说，PCR 产物的克隆，可以用于 DNA 测序、转化原核细胞、转染真核细胞研究其表达以及将多种 PCR 产物彼此分开

④ 大多数 T 加尾的克隆载体都含有 *lacZ* 基因，可以进行蓝/白斑筛选。

⑤ 使用半磷酸化的 PCR 产物（其中一条引物 5′端磷酸化）时，可以进行定向克隆。

⑥ 载体的克隆位点通常位于多连接区域，以利于使用限制性内切酶将其切除。

连接反应需要在 T4 DNA 连接酶的作用下进行几个小时。注意 PCR 使用具有 3′→5′核酸外切酶活性（校对活性）的热稳定酶产生平末端 PCR 产物，除非另外加尾，否则不能用于 TA 克隆。这一问题很好解决，只要对原来的 PCR 产物进行纯化，除去带有校对活性的酶（酚：氯仿抽提或者使用 PCR 产物纯化试剂盒），然后在平末端 PCR 产物中加入 *Taq* 聚合酶，于 72℃温育 10min，再进行一次纯化。如果没有进行第二步纯化，将降低下一步的连接反应的效率。

19.13 实验方案：平末端 PCR 产物的末端加 A

① 纯化上一步反应的 PCR 产物（可使用 PCR Pure Kit，Roche）。

② 制备加尾反应液：

平末端 PCR 产物	10.0μl
水	7.0μl
10×反应缓冲液（Mg^{2+}）	2.0μl
10mmol/L dNTP 混合物	0.5μl
Taq 聚合酶	μ0.5μl

③ 样品于 72℃温育 15min。

④ 按照第①步操作，纯化加尾的 PCR 产物。

⑤ 纯化的 PCR 产物－20℃保存。

19.14 实验方案：TA 克隆的连接反应

为了增加克隆效率，每个 PCR 产物可以做 2～3 个连接反应，载体和插入片段的比例可影响连接的效率。注意此处只建议第一次使用者进行多个连接反应。当只需要一种插入片段时，不需要大量的转化株产生，因此通常只要进行一个连接反应就可以了。

① 按照如下指南准备连接反应，注意应最后加酶。载体与插入片段的比例可以由研究

人员自定。

项　目	10×连接反应缓冲液	T 加尾的载体	PCR 产物	水	T4 DNA 连接酶
反应 1	1μl	10ng	0.1μl	补齐至 9μl	1μl
反应 2	1μl	10ng	1.0μl	补齐至 9μl	1μl
反应 3	1μl	10ng	2.0μl	补齐至 9μl	1μl

② 加入连接酶后，用微量移液器的枪头轻轻吹吸反应液使之混匀。

③ 于 16℃温育至少 3h。

注意　为经过转化和铺板得到大量克隆，连接反应通常反应过夜。

④ 在冰上融化于－80℃冻存的感受态细胞。

注意　感受态细胞应事先买好或制备好。确保所用菌株可以使用蓝/白斑筛选系统，JM109 菌株的大肠杆菌感受态细胞（Promega）符合所需要求。

⑤ 吸取 20μl 感受态细胞加入预冷的微量离心管中。

⑥ 每管加入 1μl 连接反应液，用枪头轻轻吹吸混匀。

⑦ 将反应管放入冰浴 20min。

⑧ 将反应管于 42℃水浴恰好 45s，不要摇动管子。

注意　在所有步骤中热激是最重要的一步，经常决定了转化的成败。不要使用比这里推荐的更高的温度和更长的时间。

⑨ 马上将管子置冰上 2min。

⑩ 加入 400μl 室温的 LB 培养基或 SOC 培养基❶。

⑪ 37℃摇动培养（200r/min）。

⑫ 取 10～100μl 转化反应液，加到含有相应抗生素的 LB 琼脂平板上。剩余没有使用的转化反应液于 4℃保存。

⑬ 用无菌玻璃三角棒将转化反应液尽量均匀涂布在培养基表面。

⑭ 平板向上放置至少 5min，使溶液充分被琼脂吸收。

⑮ 倒置平板 37℃培养过夜。

⑯ 第二天早上，尽早将平板从培养箱中取出，这样可以减少卫星菌落的形成。

⑰ 要检测平板上的菌落是否为转化株，使用无菌的牙签❷挑取要检测菌落的一部分，直接将这部分活菌接种到 100μl PCR 反应混合物中：10.0μl 10×PCR 反应缓冲液（含 Mg^{2+}）；2μl 10mmol/L dNTP；0.5μmol/L 下游引物（体积可变）；0.5μmol/L 上游引物（体积可变）；1μl *Taq* 聚合酶；加水至 98μl。

注意 1　PCR 的加热步骤将使加入反应液中细菌细胞解离，可以使引物与质粒上的模板（如插入片段）识别配对。

注意 2　不要加入太多的菌体。否则扩增反应会被抑制。只要用牙签接触一下菌落表面就足够。

⑱ 如果需要的话，使用矿物油覆盖在反应表面。使用与生成 PCR 产物同样的扩增参数

---

❶ LB 培养基（每升）：10g 蛋白胨，5g 酵母提取物，10g NaCl；高压灭菌。SOC 培养基（每升）：20g 蛋白胨，5g 酵母提取物，0.6g NaCl，0.19g KCl，2g $MgCl_2$，2.5g $MgSO_4$，3.6g 葡萄糖；高压灭菌。

❷ 大量的报道发现，某些品牌的木制牙签中含有 PCR 抑制剂。在使用木质牙签挑取克隆之前最好先对其进行反应抑制检测。既简单又好的解决办法就是使用塑料牙签或灭菌的一次性接种环。

进行扩增反应。

⑲ 扩增完成后，取一定量的反应液（如 10μl）进行琼脂糖凝胶电泳。含有插入片段的菌落可以扩增出与克隆前 PCR 产物大小相同的片段。

⑳ 回到可以生成 PCR 产物的原始菌落，将剩余的菌落重新划一个平板并且为长期保存制备甘油菌。

19.15 TOPO 克隆

TOPO 克隆的方法（Invitrogen）是另一种新颖的广泛应用的克隆 PCR 产物或双链 DNA 的方法。TOPO 克隆的关键是使用了 *Vaccinia* 病毒的拓扑异构酶Ⅰ。该酶既可以作为序列特异性的限制性酶（CCCTT），又可以作为连接酶。这种方法十分快捷有效，通常只要在室温花 5min，就可以获得大于 95%的克隆效率。TOPO 克隆的方法适用于 TA 克隆、平末端克隆及定向克隆。针对于不同的克隆要求，有多种 TOPO 载体可以选用。TOPO 载体已经线性化，并且拓扑异构酶Ⅰ也已经通过 3′-磷酸酪氨酸键固定了（Shuman，1994）；这种载体被称为“活化的”载体，并且不会自连。要想成功地与 TOPO 载体相连接，DNA 插入片段就需要有游离的 5′末端羟基，即生成 PCR 产物的引物不能有 5′-磷酸基团。如果要克隆的 cDNA、基因组 DNA 或限制性酶切片段的 5′末端有磷酸基团，就必须先进行脱磷酸，这一步是很容易操作的。使用 TOPO 载体进行连接的温育时间通常很短，按照要求只需要 5min。在进行连接反应时，拓扑异构酶Ⅰ就从重组质粒上脱离下来。细菌转化的过程按通常的操作不变。

19.16 参考文献

Bassett, C. L., Nickerson, M. L., Farrell, R. E., Jr., and Harrison, M. (2004). Multiple transcripts of a leucine-rich repeat receptor kinase from morning glory originate from different TATA boxes in a tissue-specific manner. *Molecular and General Genomics* **271(6),** 752.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., and Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91,** 5695.

Chou, Q. (1992). Minimizing deletion mutagenesis artifact during *Taq* DNA polymerase PCR by *E. coli* SSB. *Nucleic Acids Res.* **20,** 4371.

Dieffenbach, C., and Dveksler, G. S. (Eds.). (2003). “PCR Primer,” 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Frohman, M. A. (1995). Rapid amplification of cDNA ends. *In* PCR Primer (C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 381–409.

Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85,** 8998.

Gubler, U., and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25,** 263.

Gyllensten, U. B., and Erlich, H. A. (1988). Generation of single-stranded DNA by the

polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85,** 7652.

Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., and Loening, S. A. (1997). Betaine improves PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **25,** 3957.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., and Sninsky, J. J. (1999). "PCR Applications: Protocols For Functional Genomics." Academic Press, San Diego, CA.

Kawasaki, E. S. (1990). Amplification of RNA. *In* "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 21–27.

Loh, E. L., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., and Davis, M. M. (1989). Polymerase chain reaction with single sided specificity: Analysis of T cell receptor delta chain. *Science* **243,** 217.

Maruyama, K., and Sugano, S. (1994). Oligo-capping: A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138,** 171.

McPherson, M. J., and Hames, B. D. (Eds.). (1995). "PCR 2: A Practical Approach". IRL Press at Oxford University Press, Inc., Oxford, England.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155,** 335.

Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51,** 263.

Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120,** 621.

Olive, D. M., Simsek, M., and Al-Mufti, S. (1989). Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **27,** 1238.

Paabo, S., Gifford, J. A., and Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* **16,** 9775.

Rees, W. A., Yager, T. D., Korte, J., and Von Hippel, P. H. (1993). Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **32,** 137.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350.

Sarkar, G., Kapelner, S., and Sommer, S. S. (1990). Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* **18,** 7465.

Sellner, L. N., and Turbett, G. R. (1998). Comparison of three RT-PCR methods. *BioTechniques* **25,** 230.

Shaefer, B. (1995). Revolution in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227,** 255.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269,** 32678.

Triglia, T., Peterson, M. G., and Kemp, D. J. (1988). A procedure to *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16,** 8186.

Veres, G., Gibbs, R. A., Scherer, S. E., and Caskey, C. T. (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* **237,** 415.

Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76,** 615.

Winship, P. R. (1989). An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.* **17,** 1266.

（李伟译；金由辛校）

第 20 章　定量 PCR 技术

20.1　基本原理

作为一种被广泛使用的分子技术，PCR[1] 自诞生以来便给生物技术的各个领域带来了革新。简而言之，PCR 扩增是在引物介导下，通过酶催化作用，对特定基因组 DNA 或 cDNA 序列进行扩增。不断地重复进行样品变性、引物退火和引物延伸，超过 25～30 个循环，将导致靶分子的数量以指数倍增。在此，强烈建议那些还不熟悉基于 RNA 的 PCR 扩增机制的读者，在完整读完第 19 章后，再阅读本章。

无论是出于克隆目的还是为了间接测定转录丰度，历史上合成 cDNA 最大的困难有：①无法生成接近全长具有代表性的 cDNA 分子；②反转录过程本身效率低。如今，克服这些困难直接得益于：①RNA 模板的质量；②RNA 模板的数量；③cDNA 合成方法本身的改进（在第 18 章有详细的讨论）。

PCR 技术能提供无与伦比的扩增优势，其他传统克隆方法对 RNA 分子纯度和完整度的要求较为严格，但 PCR 所需的 RNA 样品量和纯度要求都比较低。PCR 能有这一优势，是因为 PCR 引物只对模板的一部分进行扩增。与传统的 cDNA 合成或 Northern 分析相比，PCR 扩增对部分降解的 RNA 具有更高的耐受性。尽管如此，就定量而言，起始 RNA 样品量的多少和整体扩增效率仍然是 PCR 扩增的关键参数。

如今，基于 PCR 技术转录测定实验灵敏度是非常出众的。每个月都会有创新，或是改进灵敏度极限的新方法见诸报道。但是，无论如何改进也不能达到绝对的定量。人为造成的错误无论多么微小，总会给绝对精确度带来种种挫败性的变数。

20.2　灵敏度指标

本书中罗列了数种分离 RNA 及其后续鉴定的方法。就某个具体实验的整体可靠度和灵敏度而言，应该明确的是，这些方法都各有利弊。

相对丰度常用来描述一组实验样品的 RNA 水平，其含义是，确定样本中某一个为对照（或称基线）并赋予数值 1.0，其他样品则通过与其比较而获得数值。但要注意的是，测得的相对丰度与测定方法的相对灵敏度直接相关。对相同实验样品，采用不同的测定方法往往

[1] PCR 技术现在是 Roche Molecular Systems，Inc. 与 F. Hoffmann-LaRoche Ltd. 所拥有的专利，需要经过他们的有限专利授权方可使用。PCR 必须使用经授权的热循环仪进行。欲知更多信息可与 Applied Biosystems 专利许可主管，850 Lincoln Centre Drive，Foster City，CA 94404 联系。

会得到有巨大差别的结果。

下面列出了几种常用转录测定方法的相对灵敏度，称为 RNA 灵敏度指标（RNA sensitivity index）。这些实验按照它们的灵敏度高低简要地竖排如下。灵敏度指标综合了三个因素：技术的内在难度、可重复性和目前能达到的灵敏度平均水平。以下按排名，列出了几种可用于转录定量的标准实验。

高灵敏度指标
实时 PCR(real-time PCR)
竞争 PCR(competitive PCR)
半定量 PCR(semi-quantitative PCR)
核逃逸实验(nuclear runoff assay)
核糖核酸酶保护实验(RNase protection assay)
S1 核酸酶保护实验(S1 nuclease protection assay)
Northern 分析(Northern analysis)
斑点印迹分析(dot blot analysis)
低灵敏度指标

本书前面各部分的讨论已经阐明了，并非灵敏度指标排名靠后的实验方法就不能提供有效信息这一事实。例如，经典的转录分析技术——Northern 分析，可以提供由某指定基因座编码合成的 mRNA 的天然长度，这一结果是其他灵敏度指标排名靠前的方法所无法获得的。

20.3　定量方法

所有定量的方法都是为了对转录本进行定量或是为了确认基因拷贝数而发展起来的。本章着重讨论的是对转录本进行定量的方法。由于样品与样品间 cDNA 合成效率的差异 RNA 的定量就一直是一项有挑战性的工作。在很多事例中，cDNA 合成效率的差异是由样品中的化学残留物，如乙醇、异丙醇或是从生物材料中分离 RNA 过程中残留的苯酚造成的。起初，研究者们试图利用反转录聚合酶链反应（RT-PCR）来测定转录本的丰度，因为他们认识到 PCR 终产物数量依赖于反转录酶（RT）的效率和 PCR 所选择的热稳定酶的效率。由于一种技术的总体效率是相关各步骤效率的综合效应，因此，任何一种可靠的定量方法必须将这两种酶促反应的相对效率计算在内。要记住“灵敏度指标”也是因人而异的。目前有两种被广泛认为灵敏度最高的定量技术，即竞争 PCR 和实时 PCR。有趣的是，虽然这两种方法都是独立的实验，但也可以将二者结合起来对转录丰度进行精确定量。

实验中进行标准化处理是为了能更好地比较各个样本，这一操作在研究的极早期就已开始了。就 RT 的反应产物而言，过去对 cDNA 样品进行的标准化处理一般基于反应输入的样品量（质量），通常是：①制备统一稀释度的单一 cDNA 样品；②基于 A_{260} 测定；③基于少量（cpm）同位素示踪，在 cDNA 中掺入少量同位素。尽管以上这些方法可以让研究者在细胞生化水平上有较为合理精确的认识，但现在出现了一种更为可靠的标准化操作，即测量一些对照序列或参照序列，比较它们与研究目标序列在反应中的行为。在实验中增加这样一个对照是至关重要的，因为 cDNA 合成的本性多变，通常其反应效率的范围是 10%～90%。

由于 PCR 是个指数增长的过程，因此模板的扩增程度可用以下方程描述：

$$N=N_0(1+eff)^n$$

式中 N——模板扩增程度；

N_0——起始模板数；

eff——反应效率；

n——完成的循环数。

要特别注意的是，这个数学模型可以用来估计给定反应管中 PCR 扩增的潜力。由于每个已完成的循环都会使每个进行中的“变性—退火—延伸”扩增循环的效率发生改变。在理想条件下，恰当安排实验，PCR 扩增应该对实验模板和对照模板产生同样的影响。

20.4 内源参照物

技术不稳定和研究者日常的结果差异，常常是从实验室技术到数据分析，几乎发生在每个科学研究层次的误差所造成的。为了至少阐明这一潜在问题的一个方面，常用的方法是，测定一个称为参照基因或看家基因的内源参照物或内源性标准的表达，这类基因的表达是与基础细胞代谢相关联的。总的指导思想，就是要确认那些基因的表达不会改变，或是至少在实验条件下被调控的程度是最小的。

利用看家基因的转录物，可以对两个或更多样品进行标准化处理；在检测目的基因之前或之后，在同一张膜上或同一个样品系列里可以测得看家基因。就这点而言，需要重申的事实是，由于技术机制所限，Northern 分析普遍存在灵敏度低下的问题。为了达到更高的灵敏度，可以选用核酸酶保护实验（第 16 章）和以 RT-PCR 为基础的方法（第 19 章）。无论用哪种方法，测定看家基因都是必要的。除此之外，有些研究者为了能对反转录效率和 PCR 终产物进行精确定量，喜欢在 RNA 样品中掺入已知数量的外源参照模板（在后面论及）。但是要注意的是，尽管掺入法可以对某种特定的目标转录本进行精确定量，但是对确认细胞的整体转录状态并没有帮助。

研究者应该知道，至今并不存在一个可以适用于任何系统、任何条件的全能性对照（参比）基因。这是一个生物事实。即使是常被用作对照的组成型看家基因，在细胞中的表达常常也是有差别的。这在恶性疾病相关的 RNA 测试中尤为明显。基于这个自然规律，没有一个内参照是适用于所有条件的。幸运的是化上小小代价，总能在单个模型系统里确认出 1～2 个可用的内参照。为了保证结果精确可信，较为明智的做法是在测定时至少选用两个不同的内参照基因。但是，一个大问题是，灵敏的 PCR 显示在实验刺激下，这些曾被认为是相对稳定的序列，在转录丰度上可能会有很大的改变，因此需要凭经验考虑它们的适合度。

下述基因是一些报道中常见的参照基因。为了结果的可靠性，尽管下列所述不可能毫无遗漏，但是确实突出了那些最常被考虑用作对照的基因。某个基因的转录本是否合适用作内参照转录本，这完全取决于在研究条件下该研究系统内的生化状况。尽管没有哪种基因的表达可能在任何条件下都维持不变，那些在改变的实验条件下表达差异最小的就是作为内参照最好的选择。

①β 肌动蛋白（β actin）是一个组成型表达、中等丰度的转录本；几乎在所有细胞类型中都发现了它的异构体（Kinoshita 等，1992）。β-actin 也是历史上第一个被用作内参照的基因，至今仍常被使用。但是，大量报道反复证明了 β-actin 在若干外界刺激和细胞质刺激下表达有所改变（Leof 等，1986；de Leeuw 等，1989；Dodge 等，1990；Solomon 等，1991；

Spanakis，1993）。

② 甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH），中等丰度的糖酵解关键酶。GAPDH 的转录本被广泛用作参比基因或对照。像 β-actin 的情况一样，GAPDH 的表达也在若干实验条件下有所改变（Alexander 等，1990；Mansur 等，1993；Bhatia 等，1994；Lau 等，2000）。

③ 亲环蛋白（cyclophilin）是一种参与肽键异构化的蛋白质，其基因高度保守，其 RNA 在细胞质内中等丰度表达。亲环蛋白 A 又称肽基脯氨酸异构酶。尽管通常用作对照转录本，也已证明亲环蛋白 mRNA 的表达差异（Danielson 等，1988；Haendler 和 Hofer，1995；Feroze-Merzoug 等，2002）。

④ 组蛋白（histones）是核小体形成所必需的一类家族蛋白。其转录本是丰富的，通常作为看家基因被检测（Farrell 和 Greene，1993；Robert 等，2002）。

⑤ 次黄嘌呤-鸟苷磷酸核糖基转移酶（hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transferase，HPRT 或 HGPRT），因其在细胞中回收核苷酸再利用的能力而闻名。HPRT 为组成型，以极低水平表达（Pernas-Alonso 等，1999）。但是 HPRT 水平是有波动的，尤其是在增殖细胞中表达会被上调（Steen 等，1990）。

⑥ 二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase，DHFR）是合成嘌呤、胸苷酸和甘氨酸所需的酶；同样，它的表达是细胞生长所必需的。DHFR 作为看家基因和参比基因被广泛引用（Linton 等，1989；Horikoshi 等，1992；Oleary 等，1994；Balajee 等，1999）

⑦ 26S 蛋白酶体（26S proteosome）由几个亚基组成，负责真核细胞的蛋白质裂解［泛肽-蛋白酶体途径（ubiquitin-proteosome pathway）］。针对 26S 蛋白酶体的某个亚基设计的引物和探针在若干转录测定实验中被用作对照（Bassett 等，2004；综述见 Voges 等，1999）。

⑧ 其他的基因，包括纤粘连蛋白（fibronectin，丰富的转录本，存在于细胞外基质）、转铁蛋白受体（transferrin receptor，中低丰度表达，摄铁）、泛肽（ubiquitin，一种小蛋白质，介导其他蛋白质经由蛋白酶体降解）、核纤层蛋白（lamin）、微管蛋白（tubulin，形成微管）和胆色素原脱氨酶（porphobilinogen deaminase，PBGD；位于细胞质，负责亚铁血红素生物合成的酶；Chretien 等，1988）的 mRNA 被广泛用作对照。这些基因表达的蛋白质产物，在细胞中都有其特定的功能。虽然总是有些例外，但总的来说，这些基因的表达在 mRNA 水平波动的可能性较小。但是，第一件事是要进行检测。

⑨ 28S rRNA 和 18S rRNA 是核糖体基因转录后调节的产物，高丰度，其转录产物几乎恒定不变，经常用作内源参照物（de Leeuw 等，1989；Bonini 和 Hofmann，1991）。其转录本是成熟核糖体的重要组成成分。笔者认为，将 28S rRNA 和 18S rRNA 用作电泳加样量对照，比把它们当作基因表达对照更为恰当。因为 28S rRNA 和 18S rRNA 是 RNA 聚合酶Ⅰ的产物；而 mRNA 和未剪接前体 hnRNA 则是 RNA 聚合酶Ⅱ转录合成的。这些 RNA 聚合酶对不同的生物异源物具有不同的敏感性。因此有可能某种实验操作在完全抑制 RNA 聚合酶Ⅱ转录活力时，RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ的活力丝毫未受影响，反之亦然。

⑩ 线粒体 16S rRNA，中等丰度，位于线粒体内。与细胞质中的 16S rRNA 相比，很少用作内源参照物。尽管它们是 rRNA 而非 mRNA，同样具有第⑨点所谈到的问题。有报道称，实验操作对这些由线粒体编码的基因表达所造成的影响，远低于那些定位在细胞核内的

rRNA 基因（Tepper 等，1992）。

⑪ tRNA 中包含大量在翻译过程中负责把氨基酸转运到核糖体上的高丰度转录本。有时会用 tRNA 特异性探针来检测 tRNA 的总量，作为加样量的对照。tRNA 由 RNA 聚合酶Ⅲ转录合成，因此更适合作为加样量的对照，而不是作为基因表达的对照，理由同第⑨点所述。

20.5 外源参照物

确定基因表达差异的必要性是无可置疑的。将已知数量的外源转录本掺入 RNA 样品内，可能会对精确测定样品真实的转录丰度有很大帮助。外源转录本可以由体外转录得到（Krieg 和 Melton，1987），也可以如核酮糖二磷酸羧化酶（ribulose biphosphate carboxylase；Smith 等，2003）那样购买获得。这是外源参照的一个例子。根据具体的研究计划，选用的外参照模板可以与研究目标转录本毫不相干。就这一点而言，在动物 RNA 中掺入植物转录本可能是特别有效的策略，例如与光合途径相关的核酮糖二磷酸羧化酶在动物系统里完全不可能存在。采用这类对照时，在裂解缓冲液内直接加入 1～5ng 核酮糖二磷酸羧化酶 mRNA 就和动物来源的目标 mRNA 一起被纯化和反转录。因此，在整个分离过程中，内源转录本和外源转录本就完全暴露在同样的化学环境和物理操作之下。

还有另一种做法。如果和至少一个目标转录本相关，那么外源转录本就应该是一个目标转录本的截短版本，这样：①它可以和目标转录本一起被引物和/或探针识别，并拥有和目标转录本相似的热动力稳定性；②在电泳中表现为一条独立的条带，可以和目标转录本充分分开。这类与目标转录本相似的转录模板有时被称为“仿制品”，因为它们模拟了真实模板的特性并同样被扩增。沿用这一逻辑，在 RNA 样本中掺入一个随后可以用作 RT-PCR 的真实转录本，如兔球蛋白 mRNA，也会非常有用。这样（外源的）兔球蛋白转录本将和样本中原有的其他转录本一起，以同样的效率进行反转录和 PCR 扩增。由于在各个样品中掺入的兔球蛋白 mRNA 的量是已知的，因此球蛋白特异性 PCR 产物的数量就可以作为标准化处理的基础，也可以作为比较各管反转录效率的一个指标。诸如此类的操作通常是，尤其是追求实验数据重复性时鉴别数据变异原因的有效标志。此外，通过在样品中掺入不同数量的外参照，就可以建立一个标准曲线，借着比较标准实验条带质量和观察到的实验条带强度来定量测定实验数据。

1989 年，Wang 等人首次提出了使用外源转录本作为对照，平行于实验转录本进行反转录和 PCR 扩增。他们描述的载体 pAW108（由 American Type Culture Collection，Manassas，VA 提供）包含有 12 个不同靶基因序列，可以被 5′和 3′引物识别。简而言之，就是把这些基因的序列串联在一起，构建在 T7 RNA 聚合酶启动子的 5′末端和一个编码了 poly（A）尾巴序列之间。这就为生产大量互补 RNA（cRNA）打好了基础。由于新合成的 cRNA 可以用亲和层析（第 7 章）纯化，并用分光光度法进行定量（第 8 章），因此它的浓度是精确可知的。如果在反转录前就掺入到实验用 RNA 中，那么 cRNA 就可用作内标。cRNA 与目标 RNA 处于同样的物理和化学环境中，这样就把看家基因和目标转录本之间、不同样本之间的反转录及 PCR 的效率差异降到了最小[1]。

[1] 也可以利用标准 cRNA 来提高 Northern 分析的定量范围（Wang 等，1993）。

要特别注意的是 cRNA 既可以是“正义”的也可以是“反义”的，其中前者的行为和天然 mRNA 基本一致，而后者则和天然 mRNA 互补。由于反义转录本可以和 mRNA 结合形成热动力学极为稳定的双链，在核酸酶保护等实验中具有应用价值，在前面的章节里曾被称作极好的探针。但是在定量的情况下，目的 cRNA 是体外转录中产生的正义形式，因为只有正义的 cRNA 才能在 cDNA 合成和 PCR 中成为比天然 mRNA 小的竞争分子。为了使 cRNA 扩增产物能明确地和 mRNA 扩增产物区别开，最好能在体外构建体中增加或删去一些碱基，这样虽然二者非常相似但可以用电泳把它们区别开。另一种做法是，在构建体中引入一个限制性内切酶酶切位点，这样虽然参比模板的大小和实验目标一样，但在 PCR 后对产物进行酶切即可把它们区别开来。无论采用哪种做法，由于这两种模板使用了相同的引物对，扩增中就都得以扩增；和标准曲线比较后就可以得出这两者的含量，计算方法在后文将会论及。进行以上的操作可以克服“试管效应”。

必须注意的是，与实验样品一起制备和测定标准 cRNA 是个相当麻烦的过程。许多操作并不需要测定转录本的真实数量或拷贝数。前面论述的种种方法或后面将要论述的实时 PCR，通常得到的都是相对丰度。

20.6　对照反应的规划

用于对照和目标转录本的引物有若干种方式。虽然不可能毫无遗漏，但是下面将把历史上的种种变化一一加以评价。

① 取同样实验来源的 cDNA 置于另一个反应管，加入第二套引物。这是早期使用 PCR 对转录本进行定量的做法。这种操作可能带来的严重问题如下。

a. 第二套引物的热动力学性质可能与第一套引物的有所差别，这样会导致二者的扩增效率不同。

b. 只有对照基因和目标基因的 mRNA 水平相近时，用这种方式定量才是有意义的。

c. 看家基因的 mRNA 水平在细胞周期进程中往往是不稳定的。

d. 对照 mRNA 和目标 mRNA 必须在指数扩增时被检测。

e. 对照和目标样品在不同的反应管中进行反应，可能引入反应管之间的差别。

② 在同一个反应管中加入第二套引物（Murphy 等，1990；Gaudette 和 Crain，1991）。这也被称作“多重”PCR，或者简称为“多重技术（multiplexing）”。尽管比第一种方法有所改进，但由于以下原因仍可能导致显著的误差。

a. 第二套引物的热动力学性质可能与第一套引物的有所差别，这样会导致二者的扩增效率不同。

b. 只有对照基因和目标基因的 mRNA 水平相近时，用这种方式定量才是有意义的。

c. 看家基因的 mRNA 水平在细胞周期进程中往往是不稳定的。

d. 对照 mRNA 和目标 mRNA 必须在指数扩增时被检测。

但至少，这两套引物在一个反应管里了！

③ 竞争 PCR，加入外源的能被同一套引物识别的内参照——也就是说目标 cDNA 和引入的竞争模板一起竞争同样的引物（Becker-André 和 Hahlbrock，1989；Becker-André，1991；Gilliand 等，1990；Li 等，1991）和其他反应组分。这种方法一度是定量的黄金方法，但现在已被实时 PCR 取代了。

竞争 PCR 有两种方法。一种方法是人工制备转录本（cRNA），精确定量后掺入到实验目标 RNA 内（Wang 等，1989；Ikonen 等，1992；Vanden Heuvel 等，1993）。由于直接掺入的人工转录本获得了和实验目标 RNA 一样的物理环境；并且掺入的数量精确可知，再和建立的标准曲线进行比较（图 20.1），就可以通过测定由人工转录本反转录的 cDNA 的量来确定反转录反应的进行程度。体外人工转录 RNA 的传统做法是把它的 DNA 模板和合适的转录启动子连接在一起（图 20.2）；或者可以在待转录 DNA 序列的 5′端接上噬菌体 RNA 聚合酶启动子序列（图 20.3）构建转录所需的模板，再用 PCR 扩增来进行制备（Vanden Heuvel 等，1993）。无论采用哪种设计方法，最好记得在表达的对照转录本内删除一段序列或是增加一个插入片段。因此，对照转录本因为和目标转录本共享了 PCR 引物识别序列，而成为后者的同源竞争物，它们具有同样的反转录效率和 PCR 扩增效率，最终在电泳后可凭借各自不同的分子量大小被区别开来。

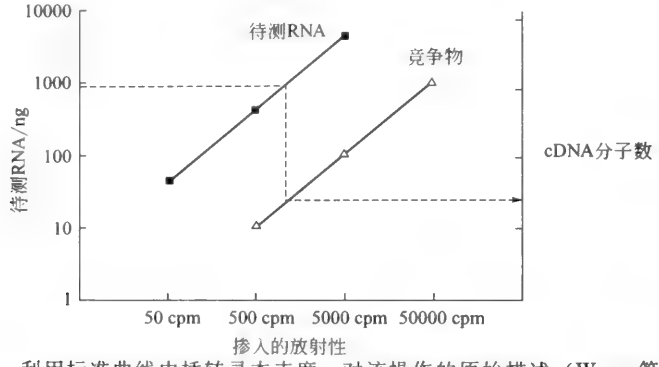


图 20.1　利用标准曲线内插转录本丰度。对该操作的原始描述（Wang 等，1989）中，用^{32}P 标记的引物进行 PCR。电泳示踪后切下条带并用 Cerenkov 计数计算掺入率。■表示样品中待测细胞 RNA 的数量，Δ表示掺入反应管中竞争 RNA 分子的数量。相同的同位素掺入量，表示相等的待测转录本分子数量。因此结果就表示为某生物来源每 1ng 或 1μg RNA 内，所含的某目标转录本的分子数（按同时扩增的 cRNA 计算得出）

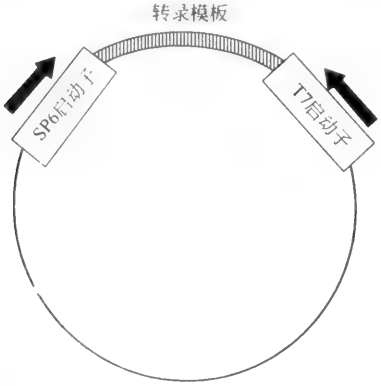


图 20.2　体外转录模板的构建。在转录启动子 T7、SP6 或 T3（可以一个或几个）附近插入模板 DNA，就能合成大量长度统一的单链 RNA 分子（载体在转录前必须线性化）。将这些转录本掺入实验样品，就可以确定反转录和 PCR 扩增的效率。该转录本也可用作核酸探针，使用细节见第 13 章和第 14 章

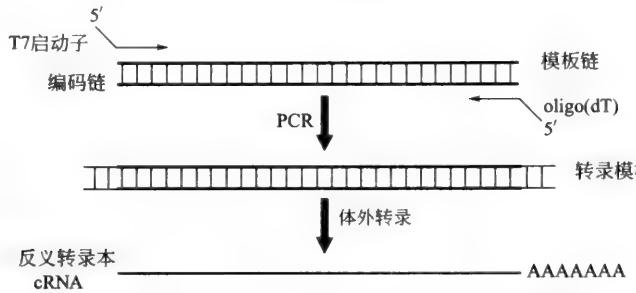


图 20.3　用 PCR 合成转录模板。体外转录可用来制备反义 cRNA 序列。制备转录模板所使用的引物对中，一个为 5′加上 T7 启动子的引物，另一个为 5′加上 oligo(dT) 的引物。加 oligo(dT) 是合成人造 poly(A) 尾所必需的，而 poly (A) 尾又是支持某些反转录所需要的条件。其他类似的策略还有用杂交探针来合成反义 cRNA 分子

竞争 PCR 的另一种方法是构建仅有引物识别序列相同的非同源模板。合成 5′部分为序列（基因）特异而 3′为竞争 DNA 特异的引物，利用 PCR 可将引物识别序列添加到竞争 DNA 的末端（图 20.4）。用这种方法构建模板后，竞争 DNA 和相应的 cDNA 使用同一对引物进行扩增。通常在 PCR 产物长度小于 300bp 时，用非同源竞争序列测定基因特异的 cDNA丰度。随着模板长度的增加，序列对 PCR 扩增效率造成的影响也会相应增加。如果定量时掺入的是 cDNA 而非 RNA，那么就不能把反转录效率估计在内。根据所做实验的需要，这一点可能重要也可能不重要。

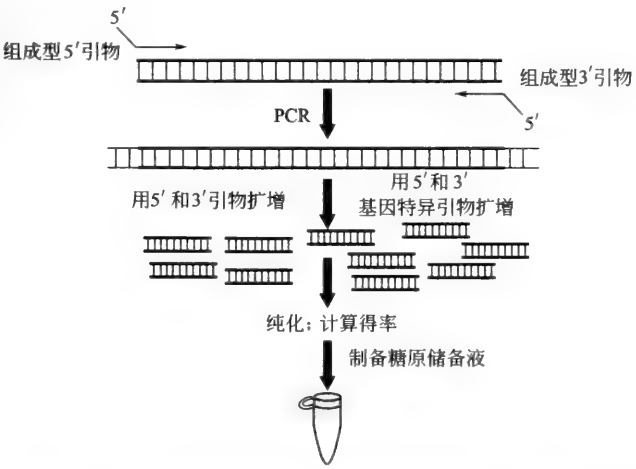


图 20.4　非同源竞争 DNA 模板的构建。合成引物的上游和下游都含有 5′基因特异序列，这些基因特异序列在 PCR 扩增后就变成竞争模板的一部分。这种添加序列的方法，和利用 PCR 在产物末端添加限制性内切酶位点或其他序列是一样的。随后的竞争 PCR 中，使用较短的只覆盖了基因特异序列部分的引物，就能同时扩增竞争模板和目标 cDNA。它们各自的扩增程度为反应管内它们的摩尔比的函数

④ 实时 PCR。后面将详细讨论的实时 PCR 是一种非常灵敏的、在动力学很广的范围内对转录本相当准确的荧光定量方法。前面讨论的对照引物和外源 cRNA 模板经修改后被用

于实时 PCR 实验，其实验事例，见 Fronhoffs 等的报道（2002）。

20.7 关于负对照

负对照的重要性足以和正对照、质量控制、上样量对照以及酶反应效率对照等相比拟。这些反应的设计，都是为了确保所有观测到的 PCR 产物都是真实可信的，而非因为加样的疏忽或扩增子（amplicon）污染造成的。现在许多实验室日常使用的便携式 PCR 工作站看上去就像一个微型桌面生物安全橱。典型的工作站通过 HEPA[1] 过滤空气建立一个无菌的加样环境，而内装的紫外灯可交联加样区游离的扩增子。许多有更多功能的工作站还具有热塑结构，在做同位素实验时保护用户不受^{32}P的辐射。

在所有重要的 PCR 对照反应中不含反转录酶（RT ）的对照是必须做的。准备一个反应管，加入所有 cDNA 合成所需的成分（RNA、核苷酸、引物等），但不加反转录酶。由于在无反转录酶的条件下无法合成 cDNA，所以从 RT 反应管中扩增出的任何产物都是基因组 DNA 污染的结果。因此习惯上是在所有 RNA 样品中都加入不含 RNase 的 DNase Ⅰ，在进行 RT-PCR 前除去内源性 DNA 模板。这是自该技术诞生以来就存在的标准操作。

最近有人提议，RT-PCR 的操作可以简化成在第一链合成之后才在样品中加入 DNase Ⅰ。之所以产生这个构思，是因为 DNase Ⅰ无法降解 mRNA：cDNA 杂交双链，系统中只有基因组 DNA 和非 cDNA 会被降解去除（Flohr 等，2003）。简而言之，MMLV 在 37℃下反应 50min 合成 cDNA 后，50℃加热 15min 使酶失活。要小心不要超过这个温度，因为较高温度下 mRNA：cDNA 杂交双链有可能解离，释放出的可能被核酸酶降解的第一链 cDNA 可能发生分子内碱基配对（暂时性的双链区）。37℃下 cDNA：mRNA 杂交双链最多与 10U DNase Ⅰ保温 2h，然后使用标准硅藻土技术彻底清除 DNase Ⅰ。虽然 DNase Ⅰ可以切割 DNA：RNA 和单链 DNA，但是其活力远低于它对双链 DNA 的降解。这个操作不适合胆小的人选用。

20.8 竞争 PCR 的关键因素

竞争 PCR 就像它的名字显示的一样，即两种模板在反应中竞争进行扩增的一种 PCR 形式（Diviacco 等，1992；Siebert 和 Larrick，1992，1993）。这只有在目标 cDNA 和竞争模板拥有相同的引物识别序列时才可能发生。引入的竞争模板可以是前面讨论过的 cRNA，也可以是反转录后得到的双链 cDNA。

一个（或两个）模板在特定反应管中的成功扩增，都是它们摩尔比的函数，尽管存在两个模板都得以扩增的可能，而其中占多数的分子在损害其他模板利益的情况下产生更多的产物。因此有如下推论，在两种分子等摩尔时它们应有相同的扩增效率。这项定量技术的好处在于，为了测定样品内未知含量的 cDNA，只要不断稀释竞争模板直到找到等摩尔的那个浓度就可以测出未知 cDNA 的含量（图 20.5），就这样简单而直接。为了方便读者，标准 RT-PCR 和竞争 PCR 的优点和缺点在表 20.1 和表 20.2 中被逐一进行比较。

[1] HEPA 过滤器：高效空气粒子过滤器。

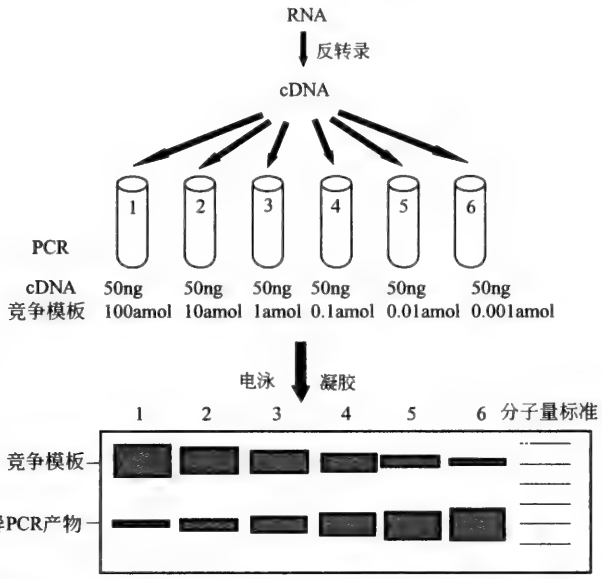


图 20.5　使用竞争 PCR 对转录本定量。在合理设计下，待测 cDNA 和竞争模板一起扩增后电泳表现为两条独立的条带。在各反应管中待测 cDNA 和竞争模板使用的引物和物理参数都是相同的。用目测法或数字图像分析软件确认电泳条带强度相等，即反应起始时二者数量相等的反应。用 $IOD_{样品}/IOD_{竞争模板}=1.0$ 的相关泳道中竞争模板的质量可以快速测定处于同一反应管内的试验模板的丰度 1.0 时的值，从而快速获得这一反应管内掺入的竞争模板

表 20.1　标准 RT-PCR 定量的优点和缺点

优点
• 设计简单
• 反应快速
• 反应可有多种用途
• 可检测丰度很低的 mRNA
• 所需的细胞数或组织量很少
• poly(A)$^+$筛选既不必须也不推荐
• 扩增中平台效应带来的问题可由在反应管中添加外源对照或/和内源对照解决
• 实验避免了杂交分析的经典难点
• 数据可重复
缺点
• 反转录反应是造成样本间差异最主要的因素
• 由于 PCR 是一种指数扩增，定量比较困难
• 不使用参照转录本很难解决平台期带来的问题
• 加样的微小差别会导致产物输出量的巨大差别
• 反应对污染敏感，尤其是基因组 DNA 的污染
• 有时数据的可重复性很成问题

表 20.2　竞争 PCR 的优点和缺点

优点
• 一套引物适用于竞争模板和实验目标模板
• 体外转录制备的 cRNA 对照转录本是反转录效率的有效指标
• 反应管中对竞争模板和 cDNA 造成影响的物理参数一致
• PCR 的平台效应对竞争模板和 cDNA 的影响相同
• 通过两种产物的比例进行定量，因此需要限制 PCR 在指数扩增期
• 数据高度可重复
• 产物可用电泳轻易分开
• 产物可用 SYBR 金轻易定量
• 不需使用同位素

续表

缺点

- 为正确确认目标模板和竞争模板的比例，需要做若干稀释梯度
- 必需耗费大量反应管
- 针对每个目标模板都需要制备对应的竞争模板
- 为构建竞争模板必须合成另一套引物
- 使用非同源 DNA 竞争模板时不能显示反转录的反应效率
- 把竞争模板作为定量工具前，必须先确认非同源竞争模板的扩增效率和目标模板的相等
- PCR 扩增后的操作费时费力

下面是设计竞争 PCR 时需要重点考虑的问题。

(1) 必须知道竞争模板的量

可以用反转录、PCR 或 RT-PCR 方法合成竞争模板，然后，模板必须经过纯化并对它的浓度进行定量。定量的方法可以用紫外吸收（第 8 章），也可以用数字图像分析（第 11 章）。通常需要合成 1～3μg 竞争模板，就像其他要求合成的反应那样。为了达到最大精确度，必须知道竞争模板的确切核苷酸数，然后用微摩尔（μmol）表示新合成的竞争模板浓度。在使用同源 RNA 竞争转录本时，通常在 100ng 细胞 RNA 中掺入稀释梯度 1～10000fg 的竞争 RNA。非同源竞争模板常重新稀释至浓度为埃摩尔（amol）级[1]的储备液，并用确切分子数来表示它们的掺入量。出于定量的目的，在保证加入样本量不变的同时，进一步稀释并加入竞争模板。只要目标模板和竞争模板的数量一致，它们的产物量也应该相同。

表 20.3 单位分析

单　位	缩　写	物 质 量	分 子 数
1 摩尔	mol	10^{0} 摩尔	6.02×10^{23}
m，毫摩尔	mmol	10^{-3} 摩尔	6.02×10^{20}
μ，微摩尔	μmol	10^{-6} 摩尔	6.02×10^{17}
n，纳摩尔	nmol	10^{-9} 摩尔	6.02×10^{14}
p，皮摩尔	pmol	10^{-12} 摩尔	6.02×10^{11}
f，法摩尔	fmol	10^{-15} 摩尔	6.02×10^{8}
a，埃摩尔	amol	10^{-18} 摩尔	6.02×10^{5}
z，色摩尔	zmol	10^{-21} 摩尔	6.02×10^{2}

注：通常 PCR 竞争模板的储备液和工作液浓度都很低，研究者较偏爱用 amol 表示模板浓度。如 1amol PCR 产物大约有 600000 个分子。

(2) 竞争模板和目标模板的扩增必须一致

选用的引物必须可以同时识别竞争模板和目标模板并有同样的扩增效率。为达到这一目的，研究者在 DNA 分子的末端添加与引物互补的序列构建出竞争模板。竞争模板应与目标模板尽量同源，在实验结束时才能做出尽可能准确的比较。因此，无可争辩的是，观察到的扩增差异就是一个序列的扩增比另一个序列更优先的缘故。通常用一套特定的引物在 cDNA 中简单地创建一个插入或缺失，就构建成了非常有用的同源竞争模板。这样制备的竞争模板与目标模板相比不是小一点就是大一点，在电泳上很容易分辨。有些场合不容易得到同源竞

[1] 为不常进行如此低浓度操作的研究者考虑，表 20.3 列出了涉及的一些单位。

争模板序列时，使用非同源竞争模板（即与研究用的实验 cDNA 无关的序列）也可以很好地进行竞争 PCR 实验，只需要如下条件。

a. 竞争模板的序列是已知的。

b. 竞争模板含有正常的（G+C）含量。

c. 竞争模板没有富含 AT 或 GC 的区域。

d. 竞争模板的大小是实验 cDNA 长度的±200bp。

(3) 目标模板和竞争模板的反转录效率必须相同

为了从 RNA 的 PCR 实验得出相关的数据，必须分析反转录和 PCR 两者的效率影响因素。目标模板与竞争模板共扩增，发生了 PCR 的效率问题：凡是对 cDNA 有影响的因素也存在于竞争模板。但是，在转录后再将竞争模板加入 cDNA 中就没有出现相关的反转录效率问题，而这在 cDNA 合成中是最常见的问题。在反转录之前用一种体外生成的转录本抑制最初的 RNA 样品，根据每一管的反转录效率作标准曲线。为了作标准曲线，必须设计对照转录本，使它能被反转录的引物识别，例如 poly(A) 可以为 oligo(dT) 识别。

(4) 必须尽量减少异二聚体的形成

异二聚体是 PCR 的产物，在竞争模板和目标 cDNA 之间相互杂交而成（即重组）。当竞争模板是野生型 cDNA 的缺失或插入形式时，异二聚体的形成特别普遍。这些异二聚体很容易被确认，因为与目标 cDNA 和竞争模板相比，它们的分子量比较高。PCR 的循环次数越多，异二聚体的形成就可能越多。在最后的 PCR 循环中形成的异二聚体特别棘手，因为这些分子下一步不能变性（Ruano 和 Kidd，1992；Jensen 和 Straus，1993）。显然，异二聚体的形成影响了 PCR 精确定量的能力。减少 PCR 的循环次数可以减少异二聚体的形成，从而降低它们带来麻烦的可能性和严重性。

(5) 检测方法必须优化[1]

竞争 PCR 的优点之一是不必用同位素标记产物。常规操作 PCR 的循环数是 25～30 轮，可以顺利地合成足量产物用于简单的凝胶染色。在这点上，SYBR 绿（Schneeberger 等，1995）和 SYBR 金比较好，因为与溴化乙锭相比，在直接目测凝胶、光记录（photodocumenting）和数码摄像时它们可以在最低限度的背景上明显增强灵敏度。DiCesare 等（DiCesare 等，1993；Wages 等，1993；Wilkinson 等，1995；Blok 等，1997）也描述了与电化学发光相关联的竞争 PCR。为了尽量减少异二聚体的形成，会减少 PCR 的循环次数，但不必担心积累产物中痕量异二聚体的检测问题，因为 SYBR 金可以让用溴化乙锭染色不可能看见的低丰度的条带也清晰可见。而且，在条带含量足以用溴化乙锭染色可见的情况下也不推荐使用溴化乙锭，因为使用这种染料通常会产生高背景，大大地降低了竞争 PCR 的定量准确性。与 PCR 循环中产物积累的检测一样，在实时 PCR 实验中检测是自动进行的。

总之，竞争 PCR 是一种极其灵敏的模板定量方法。比较所有以 PCR 为基础的实验，Northern 分析和核酸酶保护实验的数据是缺乏灵敏性的，而竞争 PCR 的优化反应灵敏性是前所未有的。使用模拟目标模板的内源竞争物，不需要测定 PCR 何时加入对数扩增期，如果 cDNA 没有进入对数扩增，那么竞争模板也不会进入对数扩增。该方法的缺点（实际上仅是一些小麻烦）是：①每个样品都需要连续稀释，必须与竞争模板标定；②必须合成两套

[1] 高度灵敏的竞争 PCR 或实时 PCR 都不需要用同位素。

引物，一套合成的引物对用于合成竞争模板，而另一套基因特异的引物对才是用于竞争 PCR 的。

20.9 竞争 PCR 的主要步骤

(1) 制备 PCR 竞争模板

① 非同源竞争模板

• 设计合成基因特异的引物（所需的两套）。先用引物进行第一次 PCR 扩增，随后用基因特异引物进行第二次扩增。尝试用 25 聚～30 聚的基因特异引物，T_m 至少 60℃。这将有利于 cDNA 扩增时有较高的产出和较好的忠实度。设计时要遵守 PCR 引物的标准指导原则（第 19 章）。

• 竞争模板的长度通常为 200～700bp。

• 竞争模板最多比目标模板大（或小）200bp。

• 纯化竞争产物；确定浓度（分光光度法或与已知标准量比较，如 ΦX174/*Hae*Ⅲ产物；见第 8 章）。

• 使用前新鲜配制滴定储备液，浓度通常为 50～100amol/μl。

② 体外转录制备同源竞争模板

• 靠近噬菌体 RNA 聚合酶启动子（如 T7、SP6 或 T3）处连接插入 cDNA。

• 体外转录，纯化转录本，定量。

• −80℃保存，使用时取出。

(2) 分离高质量 RNA

• 使用好的无 RNase 技术。

• 对细胞或组织使用适合的抽提方法。

• 优先使用硅藻土纯化或胍-酸-苯酚纯化法。

• 用无 RNase 的 DNase 处理样品。

• 用 DEPC 处理过的水配制 70% 乙醇，用来洗涤 RNA 沉淀（阳离子盐会定量结合 dNTP 而影响 PCR）。

• 用合适的方式储存纯化的 RNA（−80℃保存乙醇沉淀）。

• 如果在液态缓冲液内，分装保存于−80℃。

(3) 合成 cDNA

• 选用 RNase H^- 反转录酶。

• 合成并纯化第一链 cDNA。

• −20℃保存 cDNA，用时取出。

• 不要使用 Mn^{2+} 依赖的反转录酶。

(4) 进行初级竞争 PCR 扩增（图 20.6）

• 将竞争模板每次以 10 倍逐级稀释。

• 取各稀释浓度的 PCR 竞争模板和第一链 cDNA 一起加入反应管。

• PCR 扩增，电泳分析扩增产物。

• 测定最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度（尽管图像分析软件会更精确，但通常这一步用目测即可）。

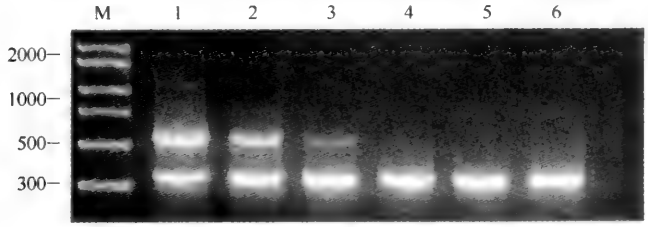


图 20.6　初步定量用的 10 倍稀释梯度。小鼠 β-肌动蛋白 cDNA 和非同源竞争模板的共扩增。制备竞争模板（540bp）的方法是如前所述的合成引物法。β-肌动蛋白（365bp）cDNA 是使用 oligo(dT) 和 AMV 反转录合成的。PCR 扩增 25 个循环后，所有 6 个样品与分子量标准对照（Sigma）一起经 2.5%琼脂糖凝胶（用 1×TAE 缓冲液配制）电泳分离。电泳后琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液稀释的 SYBR 金溶液中染色，经宝丽来 667 型底片摄影。10 倍梯度稀释系列反映了样品的基本特征，由此可以估计样品中 β-肌动蛋白 cDNA 的含量。各样本中竞争模板的含量分别为：泳道 1，10.0amol；泳道 2，1.0amol；泳道 3，0.1amol；泳道 4，0.01amol；泳道 5，0.001amol；泳道 6，0.0001amol。最符合 $IOD_{样品}/IOD_{竞争模板}=1.0$ 的是泳道 2

(5) 进行次级竞争 PCR 扩增（图 20.7）

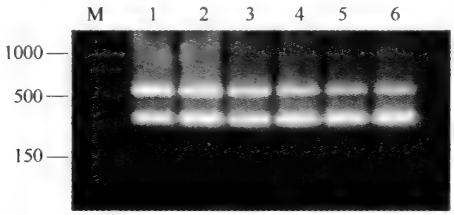


图 20.7　进一步定量用的 2 倍稀释梯度。除加入各管的竞争模板量不同之外，所有反应和分析的方法与图 20.6 描述的一致。初级扩增结果显示最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度为 1.0amol。因此这步扩增从 10amol 开始逐级 2 倍稀释：泳道 1，10amol；泳道 2，5amol；泳道 3，2.5amol；泳道 4，1.25amol；泳道 5，0.625amol；泳道 6，0.3125amol。碰巧最符合的又是泳道 2，表明样品中含有的 β-肌动蛋白 cDNA 大约为 5amol 或接近 120000 个分子

• 从储备液开始配制一系列 2 倍稀释的竞争模板，储备液浓度是最终稀释液浓度的 10 倍以上，而最终稀释液的浓度接近于目标 cDNA 初级扩增物的浓度。

• 取各个 2 倍稀释的 PCR 竞争模板和第一链 cDNA 一起加入反应管中。

• PCR 扩增，电泳分析扩增产物。

• 测定最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度。尽管图像分析软件会更精确，但通常这一步用目测即可。

• 预期能检测到基因表达高低（转录本丰度）为 2 倍的改变，当然分辨率也是 2 倍。

20.10　实验方案：竞争 PCR

下列操作步骤适用于使用合成引物制备非同源竞争模板。反应产物随后掺入 cDNA 样品进行竞争 PCR 扩增。如果使用了体外转录的人造对照转录本，则目标 RNA 和对照 RNA 应加入同一个反应管中进行反转录反应。

20.10.1 非同源竞争模板的合成

不同的 PCR 竞争模板是使用各自特有的合成引物在不同反应管内制备的。一旦合成完毕，产物的一部分就被用作再扩增的模板。注意 PCR 程序可能在不同的热循环仪上有所不同。

① 混合。

10×PCR 缓冲液	5μl
25mmol/L $MgCl_2$	3μl
10mmol/L dNTP	1μl
竞争模板	Xμl(建议使用 1ng)
10μmol/L 5′合成引物	2μl
10μmol/L 3′合成引物	2μl
灭菌水	(36.5−X)μl
Taq 聚合酶	0.5μl

② 如果需要，在反应液上覆盖矿物油。比较理想的是使用带热盖的热循环仪，这样就可以省去此步骤。无论加还是不加矿物油，用离心机短暂离心样品。

③ 进行 PCR 循环。

起始的解链	94℃	3min
扩增	94℃	1min
	X℃	1min
	72℃	1min
		20 个循环
最后的延伸	72℃	10min
保存	4℃	

注意 1 不同引物的退火温度不同。

注意 2 由于合成引物的 5′端有外加的悬垂部分，可能需要把退火温度设得比 T_m 值低几度让引物能更好地退火。

④ 用水 1∶500 稀释第③步得到的 PCR 产物，取其中部分再次扩增。保留一些未稀释的 PCR 产物作为下一次扩增电泳的对照。

⑤ 混合。

10×PCR 缓冲液	5μl
25mmol/L $MgCl_2$	3μl
10mmol/L dNTP	1μl
第④步稀释物	2.5μl
10μmol/L 5′cDNA 引物	2μl
10μmol/L 3′cDNA 引物	2μl
灭菌水	34μl
Taq 聚合酶	0.5μl

⑥ 如果需要，在反应液上覆盖矿物油。无论加还是不加矿物油，用离心机短暂离心样品。

⑦ 进行 PCR 循环。

起始的解链	94℃	3min
扩增	94℃	1min
	X℃	1min　20 个循环
	72℃	1min
最后的延伸	72℃	10min
停放	4℃	

注意 1　不同引物的退火温度不同。

注意 2　如果扩增 20 个循环后产物还是很少，再加 5 个循环。

⑧ 取第⑦步所得的部分产物和第④步保留的未稀释部分一起电泳，染色后拍照。

⑨ 第⑧步所得的 PCR 产物就是竞争 DNA 模板，必须纯化去除其中的原反应成分。最有效的纯化方法是使用硅藻土层析的快速清除试剂盒，如 PCR Pure Kit（Roche）。

⑩ 用 A_{260} 或图像分析测定竞争模板的浓度和产量（第 11 章）。−20℃保存竞争模板。

⑪ 取部分模板在使用前现配成 100amol/μl 的竞争模板储存液。稀释最好用 10μg/ml 糖原，如有必要则使用 PCR 的 TE 缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.5；0.1mmol/L EDTA）。稀释的竞争模板溶液配好立即使用，实验完毕如有剩余则弃去不要。

20.10.2　第一链 cDNA 的合成

① 确保能足以合成第一链 cDNA 的高质量 RNA。进行小块凝胶电泳，观察核糖体 28S RNA 和 18S RNA，确保 18S RNA 下面拖尾最少。见第 5 章和第 6 章的纯化选择。

② 制备 cDNA 混合物。

		[终浓度]
DEPC 处理的水	3μl	—
25mmol/L $MgCl_2$	4μl	5mmol/L
10×缓冲液❶	2μl	1×
10mmol/L dNTP	2μl	1mmol/L
oligo(dT)❷	2μl	2.5μmol/L
RNasin	1μl	2.5U/μl

将混合液置于冰上。

③ 取灭菌的微型离心管加入 500ng RNA（2μl；250ng/μl）、3μl 不含核酸酶的水。65℃加热 2min。

④ 将所有 cDNA 混合物（第②步制备的）转移到含有热变性 RNA 的反应管内。

⑤ 室温静置 3min 让引物退火。

⑥ 加入 1μl 反转录酶；轻柔吸打混合液使混合均匀，禁止涡旋。

⑦ 42℃保温 30～60min（AMV），或 37℃保温 30～60min（MMLV）。

⑧ 95℃加热 5min 使酶灭活，置冰上保存至下一步操作。

20.10.3　竞争 PCR（初级扩增）

初级扩增的目的是为了确认目标 cDNA 的近似含量。由于反应体系内原始转录本丰度

❶ 10×第一链缓冲液：100mmol/L Tris，pH8.3；500mmol/L KCl。各大生物制品供应商都供应合成第一链 cDNA 所需的整个系统。

❷ 可以用 1μg 随机引物代替 oligo(dT)，或添加随机引物与 oligo(dT)协同进行 cDNA 合成。

的不同 cDNA 在量上有巨大的差别，基本上初级扩增只需进行一次。在初步确认了最接近目标 cDNA 的竞争模板稀释度后，再进一步 2 倍逐级稀释竞争模板以细化目标模板的浓度区间。当然，如果因实验条件的改变造成了 mRNA 丰度上的巨大变化，就需要重新进行 10 倍稀释梯度的操作。

① 为每个需要测定的样本准备 13 个反应的 PCR 总混合液（12 个反应和 1 个富余的）（见表 20.4）。

表 20.4 PCR 总混合液

PCR 总混合液	每 50μl 反应	[终浓度]	6 个反应(×7)	12 个反应(×13)
10×PCR 缓冲液	5.0μl	1mmol/L	35.0μl	65.0μl
25mmol/L $MgCl_2$	3.0μl	1.5mmol/L	21.0μl	39.0μl
灭菌水	34.5μl	—	241.5μl	448.5μl
10mmol/L dNTP	1.0μl	0.2mmol/L	7.0μl	13.0μl
5′cDNA 引物(20μmol/L)	1.0μl	0.4μmol/L	7.0μl	13.0μl
3′cDNA 引物(20μmol/L)	1.0μl	0.4μmol/L	7.0μl	13.0μl
cDNA①	2.0μl	可变	14.0μl	26.0μl
Taq 聚合酶② (5U/μl)	0.5μl	2.5U/反应	3.5μl	6.5μl
总体积	46.0μl		322.0μl	598.0μl

① 只有热启动 PCR 时才在总混合液内加入 cDNA，否则就可能在起始解链前合成非特异产物。一旦有非特异产物生成，就相当于在竞争 PCR 系统内又加入了一个竞争物。在没有热启动时，最好在第⑥步加入竞争模板后再加入 cDNA。

② 其他热稳定酶，尤其是使用热启动配方的酶，可能会得到比只用 *Taq* 聚合酶更好的结果。

② 取 6 个 PCR 管标上 P_1～P_6。

③ 为制备 10 倍稀释梯度的竞争模板，用 TE 缓冲液（10mmol/L Tris，pH7.5；0.1mmol/L EDTA）配制浓度为 10μg/ml 的超纯糖原溶液，以上 6 管每管分别加入 9μl。

④ 指定竞争模板储存液（100amol/μl）为 P，按下列操作 10 倍梯度稀释竞争模板。

管　号	稀释方式	[终浓度]
P_1	加 1μl P，混合	10amol/μl
P_2	加 1μl P_1，混合	1.0amol/μl
P_3	加 1μl P_2，混合	10^{-1}amol/μl
P_4	加 1μl P_3，混合	10^{-2}amol/μl
P_5	加 1μl P_4，混合	10^{-3}amol/μl
P_6	加 1μl P_5，混合	10^{-4}amol/μl

⑤ 再取 6 个 PCR 管标号。

⑥ 各管中加入：

2μl 新鲜配制的稀释液（P_1～P_6）

48μl PCR 总混合液❶（第①步）

50μl 总体积

⑦ 短暂离心，使所有反应液沉降到管底。

❶ 另一种做法是用随机引物（1μg）代替 oligo(dT)，或将加随机引物与 oligo(dT) 协同进行 cDNA 合成。

⑧ 进行热循环。

起始的解链	94℃	3min
扩增	94℃	1min
	X℃	1min　25 个循环
	72℃	2min
最后的延伸	72℃	5min
保存	4℃	

注意　退火温度是由引物决定的。

⑨ 准备 2.5%的琼脂糖凝胶，用 1×TBE 或 1×TAE 缓冲液配制。

⑩ 每管中取 10μl 加到新反应管中。如果反应液面上覆盖了矿物油（老式热循环仪），在转移到新反应管前用纸（Kimwipe）擦一下枪头的外侧。加入 1.0μl 10×上样缓冲液。

⑪ 上样，电泳。不要忘了加分子量标准作为对照。

注意 1　胶跑得越慢分辨率越高。并且，琼脂糖浓度可根据需要增加或降低。

注意 2　常用的分子量标准对照是 Promega 公司的 No. G3161：1000bp、750bp、500bp、300bp、150bp 和 50bp。

⑫ 电泳后，用 1×TBE 或 1×TAE 缓冲液配制 1×SYBR 绿Ⅰ染色。在紫外灯下（在紫外线照射下注意保护眼睛和皮肤）检查电泳凝胶并拍照。

⑬ 确定最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度。通常目测已足以对这一系列 10 倍稀释梯度做出判断，但是图像分析软件可提供更精确的每个条带的综合光密度（integrated optical density，IOD）和每对条带之间的比例。

20.10.4　竞争 PCR（次级扩增）

一旦确认了竞争模板产物与目标 cDNA 最接近的稀释倍数，则该倍数的 10 倍即被用作次级扩增中 2 倍梯度稀释的起始浓度。在次级扩增反应里 2 倍稀释梯度是为了能对目标样本内基因特异性 cDNA 的数量测定进行微调。出于对稳定性和重复性的考虑，使用和初级扩增时同样体积的 PCR 总混合液。总混合液应该放置在冰上；如果是预先准备好的，则应该在加入 *Taq* 聚合酶或其他聚合酶之前将总混合液冻存。

① 取 6 个 PCR 管标上 S_1～S_6。

② 为制备 2 倍稀释梯度的竞争模板，以上 6 管中分别加入 5μl 浓度为 10μg/ml 的超纯糖原［用 PCR TE 缓冲液（10mmol/L Tris，pH8.0；0.1mmol/L EDTA）配制］。

③ 从 10 倍于最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度（10^x，指定为管 P_x）开始稀释，按下列操作以 2 倍为梯度稀释竞争模板。

管　号	稀释方式	［终浓度］
S_1	加 5μl P，混合	$5\times10^{x-1}$amol/μl
S_2	加 5μl S_1，混合	$2.5\times10^{x-1}$amol/μl
S_3	加 5μl S_2，混合	$1.25\times10^{x-1}$amol/μl
S_4	加 5μl S_3，混合	$6.25\times10^{x-2}$amol/μl
S_5	加 5μl S_4，混合	$3.125\times10^{x-2}$amol/μl
S_6	加 5μl S_5，混合	$1.56\times10^{x-2}$amol/μl

④ 再取 6 个 PCR 管标号。

⑤ 各管中加入：

2μl 刚配好的稀释液（S_1～S_6）

48μl PCR 总混合液[1]［见 20.10.3 竞争 PCR（初级扩增）第①步］

50μl 总体积

⑥ 短暂离心，使所有反应液沉降到管底。

⑦ 进行热循环。

起始的解链	94℃	3min
扩增	94℃	1min
	X℃	1min
	72℃	2min
		25 个循环
最后的延伸	72℃	5min
保存	4℃	

注意 确保使用的参数与 10 倍稀释梯度时所用的完全一致，包括使用的退火温度。

⑧ 准备 2.5%的琼脂糖凝胶，用 1×TBE 或 1×TAE 缓冲液配制。选用初级扩增分析所用的同样的琼脂糖和电泳参数。

⑨ 每管中取 10μl 加到新反应管中。如果反应液面上覆盖了矿物油（老式热循环仪），在转移到新反应管前先用纸（Kimwipe）擦一下枪头的外侧。加 1.5μl 10×上样缓冲液。

⑩ 上样，电泳。不要忘了加分子量标准作为对照。

⑪ 电泳后，用 1×TBE 或 1×TAE 缓冲液配制 1×SYBR 绿Ⅰ染色。在紫外灯下（在紫外线照射下注意保护眼睛和皮肤）检查电泳凝胶并拍照。

⑫ 确定最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度。由于这一系列样品的稀释梯度仅为 2 倍，因此可以利用图像分析软件判断最接近目标 cDNA 的竞争模板浓度，即 $IOD_{样品}/IOD_{竞争模板}=1$ 的那个样品。

20.11 关于图像分析的考虑

就凝胶所得的结果进行竞争 PCR 分析的能力依赖于最初凝胶电泳的效果和图像的质量。正如第 11 章所述，不少研究者错误地认为昂贵的图像分析系统可以弥补质量差的凝胶电泳和低质量的图像。但事实上，凝胶分析的精确度和可重复性从一开始就与凝胶电泳和/或照片有直接关系；在相当大程度上，对图像分析进行优化选择的重要性不亚于对 PCR 或其他反应的优化过程。建议读者们重温第 11 章数字图像分析优化的相关建议。

至于竞争 PCR，从 EB 染色的凝胶内获取数据并不是件容易的事。这是因为 EB 染色会导致凝胶内的较高背景。用染料 SYBR 绿或 SYBR 黄显然就要好得多。无论是进行目测分析还是数字图像分析，较好的凝胶质量无疑有助于得到更高的精确度。如果需要的话，在 PCR 中还可以添加放射性标记的 dNTP，这样就可以用放射自显影和液闪计数来进行测定。其实，此类实验并不需要进行放射性标记，放射性标记常带来一些副作用，因此，不推荐这

[1] 另一种做法是用随机引物（1μg）替代 oligo(dT)，或添加随机引物与 oligo(dT) 协同进行 cDNA 合成。

种做法。

20.12　竞争 PCR 的问题解答

PCR 对各反应组成物的精确浓度无疑是非常灵敏的。所以在定量实验中如何精确吸取组分为 cDNA 合成反应和 PCR 配制总混合液就至关重要。以下列出的条件是关系到减少影响因素，最大程度提高可重复性和产量。

(1) 不可变更的条件 (non-negotiables)

① 高质量的 RNA

- 用好的无 RNase 技术。
- 用硫氰酸胍或盐酸胍裂解缓冲液。
- 用酸性酚抽提。
- 用胍盐缓冲液两次沉淀。
- 用无 RNase 的 DNase 处理样品。
- 用 DEPC 处理的水配制的 70%乙醇彻底冲洗 RNA 沉淀[1]。
- 妥善储存纯化好的 RNA。

② cDNA 反转录和随后的 PCR

- 每个 cDNA 反应使用等量的 RNA (200～500ng)。
- 使用缺乏内源 RNase H 活性的酶更好。
- 避免依赖 Mn^{2+} 的反转录反应。
- 保证使用 cDNA 反应总混合液。
- 保证使用 PCR 总混合液。

(2) 常见问题

① 一条或数条泳道拖尾

- 优化 Mn^{2+} 浓度 (通常做一个递减 0.1mmol/L 的梯度)。
- 减少循环数。
- 减少反应内的酶量。
- 使用热启动 PCR。

② 没有产物

- 检查 RNA。
- 加一种 RNase 抑制剂 (如 RNasin)。
- 检查反转录和 PCR 的反应组分，尤其是酶。
- 检查反应所用的各个组分。
- 检查 PCR 循环参数。

③ 产量低下

- 检查样品均质化或裂解是否完全。
- 检查最终得到的 RNA 沉淀是否溶解充分。
- 测定 A_{260}/A_{280} 是否小于 1.65 (说明有蛋白质或其他杂质污染)。

[1] 阳离子盐会定量地与 dNTP 结合，破坏 cDNA 合成和 PCR。

- 检查 RNA 降解状况。
- 获得的组织没有立刻处理或冷冻。
- 纯化的 RNA 储存在－20℃而非－80℃。
- 液相溶剂或所用反应管不是无 RNase 的。

④ DNA 污染

- 如果样品未经 DNase 处理就可能发生 DNA 污染。
- 确保加上 RT⁻对照以证实是否有 DNA 污染。

⑤ 数据不重复

- 使用薄壁管（200μl 工作良好）；如果选用了厚壁管，那么就延长循环参数。
- 考虑使用热启动 PCR（见第 19 章）。
- 每种细胞类型准备一大管反应总混合液，然后分装到各反应管。
- 选用 T_m 更接近的上游和下游引物对。
- 考虑选用为长程 PCR 设计的（如 AccuTaq L. A.，Sigma 产品）混合酶（如 *Taq*＋校对酶）。这些酶协同作用下能产生更多产物和更高忠实度。
- 考虑去除矿物油，使用有热盖的 PCR 热循环仪。
- 是否用同样方法但这次没有抽提出 RNA。
- 是否同一天使用同样方法但这次没有抽提出 RNA。
- 是否同一操作者抽提但这次没有抽提出 RNA。
- 检查细胞或组织生长的状态。细胞处于不同的细胞周期或是组织来源于不同生化背景的个体，结果可能不重复。
- 检查是否用了不同的反应总混合液。
- 确认最近是否校正过微量移液器。
- 优化并在热循环仪上进行反应（而非同一型号）。
- 购买预制胶。琼脂糖和聚丙烯酰胺的预制胶都有供应。

(3) 常规建议

- 变性步骤越短越好。
- 变性温度尽可能低（90～92℃）。
- 降低延伸温度到 68℃。
- 每个循环延长延伸时间（5～20s/循环）。
- 磨砺微量移液技术，这对实验的重复非常重要。固定时间校正微量移液器。
- 确保各样品中加入的 RNA 量是一致的。竞争 PCR 对加入的 RNA（在 cDNA 合成时）和 cDNA（在 PCR 扩增时）量极为敏感。就像绝大多数 RT-PCR 的“少即是多”，即在反应中过量的模板通常会对产量有副作用。混合 PCR 反应液时，可以在吸取组分后，先擦拭微量移液器枪头的外表面，再分装入反应管内。这样可避免将枪头外表面的液滴带入反应而造成意外的影响。
- 遵守标准方法防止引入污染，包括带滤芯的移液枪头或容积式枪头（positive displacement micropipettors）。
- 考虑使用硅烷化处理的微型离心管（见附录 8）。因为 cDNA 和 PCR 产物在扩增前都是皮克（pg）级的（或更少），而这类反应管可将各种操作的损失降至最小。用超纯的糖原对微量模板进行稀释也是很有利的。

20.13　实时 PCR

现在广为人知的实时 PCR（real-time PCR，RT-PCR）（Higuchi 等，1992；Higuchi 等，1993）对基因和转录本进行定量，是一个重大突破。这项利用荧光技术的方法，在 PCR 累积过程中对产物进行定量，并不需要在固定循环数的扩增结束之后再用电泳对产物的量和种类进行鉴定，即终点实验。最近，许多科学文献将实时 PCR 称作“新的 RT-PCR”。但是 RT-PCR 事实上直接指代的是 cDNA 的合成和随后的扩增，可能根本不涉及实时 PCR 的应用，因此，这种命名常常带来混乱。就像本文对实时 PCR 的描述那样，指出所进行的分子技术则不会给读者带来理解上的问题。

实时 PCR 需要某种荧光标记试剂，一台带有荧光激发设备的热循环仪，通常和光纤系统相连的灵敏的冷却电离耦合（charge-coupled device，CCD）相机，以及控制以上设备的电脑。简而言之，就是根据 PCR 过程中荧光增长水平来推测转录本的丰度；因此，这些数据和用于精确定量的标准曲线相关。如果与看家基因 GAPDH 或 HPRT 比较得到的相对丰度仍不能满足研究者的需要，在希望能确切知道某种 mRNA 的拷贝数时，那么如前所述，可以将 cRNA 参照和实时 PCR 联用。在检测 cDNA 合成或 cDNA 扩增时是否有抑制剂这些对照也很有价值。总的来说，这一方法超常的灵敏度已被广泛接受，因为它甚至能检测单个细胞（Smith 等，2000）或是单个基因的单个拷贝（Wettwer 等，1997）。

实时 PCR 操作在检测转录本丰度方面有如下若干优于传统方法之处。

① 与竞争 PCR 相比更节省时间。

② 更快速和更高通量。

③ 广泛的定量动力学范围，通常为 6～8 个数量级。

④ 大部分为自动化过程。

⑤ 反应管为封闭系统，从而降低了样品间污染、实验室扩增子污染和由样品操作引入的可变因素。

⑥ 没有 PCR 后的样品操作。

⑦ 附带进行精确分析的软件。

⑧ 常规的熔点曲线分析可以区分 PCR 产物和引物二聚体。

⑨ 可以在 cDNA 进行 PCR 扩增的指数期判定起始的 RNA 模板数。

初次发表的实时 PCR 操作利用了溴化乙锭（EB）的荧光发射。因为 EB 可以嵌入 PCR 产物的双链，和产物成比例地结合并发出荧光，这被称为嵌合法（intercalator-based detection）。尽管和传统的 PCR 方法相比要可靠些，但嵌合物所反映的既包含了 PCR 中的特异产物，也包含了非特异产物。只要是做过 EB 染凝胶的人都知道，EB 造成的凝胶内部荧光背景始终是个大问题。于是，用仅与双链 DNA（即 PCR 产物）结合才发射荧光的 SYBR 绿 I 代替 EB，这个问题也因此有所改善。尽管如此，非特异产物的荧光发射（假阳性）依然存在，任何合成的双链产物，无论是特异的还是非特异的，都能导致荧光信号的增加。

为了解决这个内在问题，后来又改进并发展出了探针法（probe-based detection）。与嵌合法相比，利用探针法得到的分辨率更高。这种新方法最初被称作荧光生成 5′-核酸酶实验（fluorogenic 5′-nuclease assay）[1]。设计双标记荧光染料的寡核苷酸探针（Lee 等，1993；

[1] 不要将此命名与第 16 章谈到的核酸酶保护实验混淆。

Livak 等，1995），使之可以和模板旁侧序列的 5′端和 3′端引物之间的区域结合；在探针的 5′端标记荧光报告基团，常用的有 6 羧基荧光素（6-carboxyfluorescein，6-FAM）；在探针的 3′端或者临近区域标记荧光猝灭基团 6-羧基 四甲基-罗丹明（TAMRA™）。由于单个探针内荧光报告基团和猝灭基团的空间定位接近，所以抑制了报告基团的 Förster 共振能量转移（Förster resonance energy transfer）。Förster 共振能量转移又称荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer），简称为 FRET（Förster，1946，1948）。由于设计探针时使其 T_m 温度高于引物温度，探针与模板的退火就比引物对相应位点的退火更快。在 68～72℃之间上游引物延伸时，伴随 *Taq* 聚合酶的 5′→3′核酸外切酶活性遂取代并切割了与靶链结合的寡核苷酸探针。如此这样，所谓的荧光报告基团从探针中被释放出来，不再受荧光猝灭基团的影响，在热循环仪各孔上方的激光激发下发射出荧光。探针原先结合抑制了部分模板，随后探针被取代，*Taq* 的 5′→3′聚合酶活性因此通过这部分模板继续合成，最终产生 PCR 产物（图 20.8）。随着这一过程的不断重复，从探针荧光猝灭基团附近释放出来的 5′荧光报告基团逐渐增多，光纤-CCD 系统就可以检测到愈来愈多的荧光信号。这一实验目前被广泛称作 TaqMan 实验。以前，常用薄层层析来检测探针取代过程中释放的 5′末端标记^{32}P，并以此为反应结束时的检测指标；而在本书纂写期间市面上最新版的实时 PCR 热循环仪装备了若干检测通道，可以让研究者胸有成竹地进行多重反应。由于多重反应内加入了若干种引物对和探针，完成一套反应所需的时间大大减少，相应的生产率则惊人地增长。

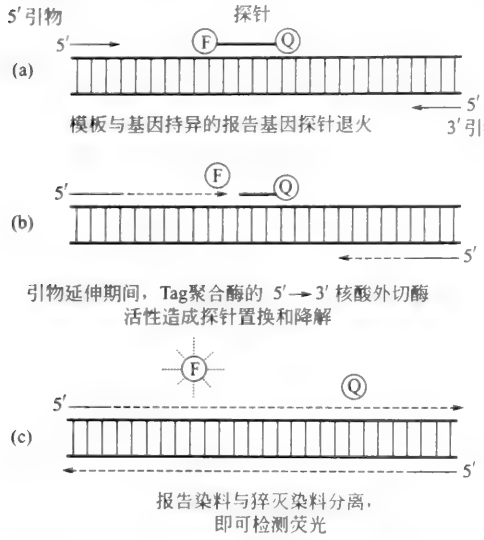


图 20.8 实时 PCR。（a）含有荧光报告基团（F）和荧光猝灭基团（Q）的荧光探针和模板退火。只要保持了探针的完整性，报告染料的荧光就被附近的猝灭染料所猝灭。（b）在 PCR 过程中，*Taq* 聚合酶的 5′→3′核酸外切酶活性造成探针的置换，并将探针切割降解。（c）一旦与猝灭染料分离，报告染料的荧光（发生和累积）即被实时测量。荧光的发射和 PCR 产物的产生直接相关。然后，PCR 引物继续延伸并通过暴露出的区域形成完整的产物

关于数据分析，实时 PCR 的分析软件可计算阈值循环数（threshold cycle，C_T）。阈值循环数即样品发射的荧光达到 10 倍于基线（或是其他指定的倍数）的循环数。在实时 PCR 起始时，保证产物累积和模板起始量呈线性关系非常重要。反应起始时的模板量越多就越容易（快）检测到明显的荧光增强（图 20.9）。如果实验使用的是 Roche 光循环仪（图 20.10）或是 Perkin Elmer ABI PRISM7700HT 测序检测仪来检测荧光信号，那么在反应结束时无需对样品进行任何操作。这些数据随后会与标准曲线（图 20.11）比较，从而得出对起始模板的精确定量。

由于几个显而易见的理由，实时 PCR 系统显得特别有诱惑力。由于定量行为和基于电脑的自动操作联系在一起，在各个连续循环中收集数据并立刻分析。该操作将此类实验的动力学线性范围拓展到对数为 7 的范围。由于进行实验的反应管到结束时也不需打开，理论上

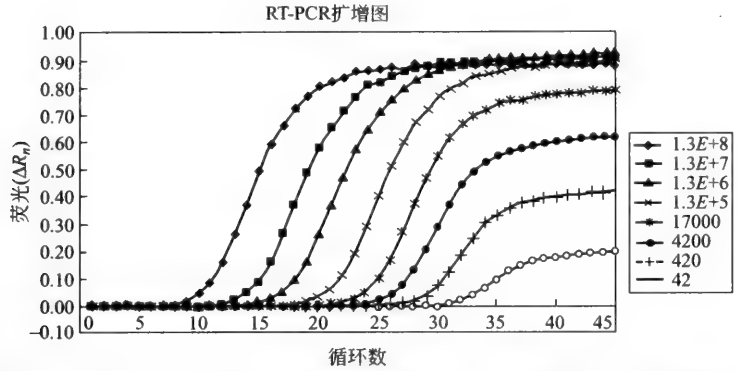


图 20.9　实时 PCR 在各个循环结束时测量 PCR 产物的量，对循环数函数作图。重要参数阈值循环数即 C_T，表明产物数量已累积到预定水平。起始材料（如基因组 DNA 或 cDNA）的含量越少，C_T 就越高（本图由 Applied Biosystems，Inc. 的 K. J. Livak 博士提供）

图 20.10　光循环仪实时 PCR 系统（由 Roche Applied Science 提供）

减少了扩增子污染和实验室污染的可能性。更有甚者，由于有若干种报告荧光标记物可供选用，进行多重反应也成为可能。这种方法的缺点是购买此类仪器通常需要 5 万美元或更多，合成针对各目标基因所需的、带有不同荧光基团标记的寡核苷酸探针也颇为昂贵。无论如何要强调的是，虽然实时 PCR 能同时检测若干基因，但想检测更多基因的话，这就不是一种合适的选择了。通常，研究者先用第 23 章描述的芯片技术预筛选基因的差异表达。然后，在确认了上调序列和下调序列之后，再用实时 PCR 来确证那些推定的基因调控。

显然，实时 PCR 有很广泛的潜在用途，包括检测病原体、分子诊断、突变检测、检测可变剪接、对存档很久的组织样品进行分析、长期的室内研究和在要求高通量的实验室内使用。在世界范围的合作研究基础上，有关的实验室必须将所有实验操作步骤标准化，并确立几种对照或参照 RNA 用以进行定量分析。大多数主要的生物技术供应商都提供几种不同组织来源的细胞系和不同丰度 RNA 转录本的集合（讨论见第 7 章）作为参照 RNA。由于每一批号的参照 RNA 都是由大规模工业化制得的，因此，在相当长时间内可以购得同一批号

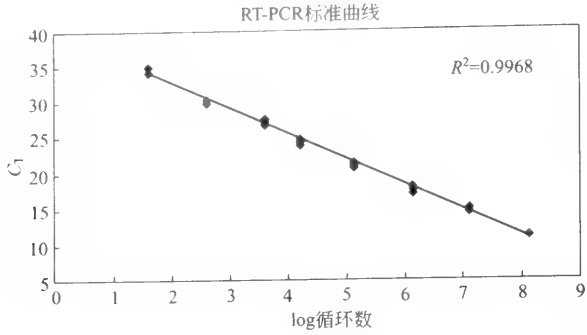


图 20.11 如果需要确定绝对数量（某种程度而言用词不当），那么就按常用方法制备已知模板量的梯度稀释并测量、制作标准曲线。但是，如果实验最终要求的是相对丰度，那么实时 PCR 就应将目标基因的累积产物与对照基因或看家基因（如 GAPDH 或 β-肌动蛋白）的产物直接进行比较。在标准曲线分析的基础上，模板的起始拷贝数与阈值循环数（C_T）呈函数关系（本图由 Applied Biosystems，Inc. 的 K. J. Livak 博士提供）

的 RNA，不同地域的用户也很容易买到同样的对照材料。更有甚者，一些供应商还提供热启动配方的实时 PCR 总混合液（如 Sigma 公司的 Jump Start）。

20.14 参考文献

Alexander, M., Denaro, M., Galli, R., Kahn, B., and Nasrin, N. (1990). Tissue-specific gene regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene by insulin correlates with the induction of an insulin-sensitive transcription factor during differentiation of 3T3 adipocytes. *In* "Obesity: Toward a Molecular Approach" (G. Bray, D. Ricquier, and B. Spiegleman, Eds.), pp. 247–261. A. R. Liss, Inc., New York.

Balajee, A. S., May, A., and Bohr, V. A. (1999). DNA repairs of Pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* **27,** 2511.

Bassett, C. L., Nickerson, M. L., Farrell, R. E., Jr., Artlip, T. S., Ghaouth, A. E., Wilson, C. E., and Wisniewski, M. E. (2005). Characterization of an S-locus receptor protein kinase-like gene from peach. *Tree Physiology* 25.

Becker-André, M. (1991). Quantitative evaluation of mRNA levels. *Methods Mol. Cell. Biol.* **2,** 189.

Becker-André, M., and Hahlbrock, K. (1989). Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcription titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* **17,** 9437.

Bhatia, P., Taylor, W., Greenberg, A., and Wright, J. (1994). Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and 28S ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* **216,** 223.

Blok, H. J., Gohlke, A. M., and Akkermans, A. D. L. (1997). Quantitative analysis of 16S rDNA using competitive PCR and the QPCR System 5000. *BioTechniques* **22,** 700.

Bonini, J. A., and Hofmann, C. (1991). A rapid, accurate nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *BioTechniques* **11,** 708.

Chretien, S., Dubart, A., Beaupain, D., Raich, N., Grandchamp, B., Rosa, J., Goossens, M., and Romeo, P. H. (1988). Alternative transcription and splicing of the human por-

phobilinogen deaminase gene results either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85,** 6.

Danielson, P., Forss-Petter, S., Brow, M., Calavette, L., Douglas, J., Milner, R., and Sutcliffe, J. (1988). A cDNA clone of the rate mRNA encoding cyclophilin. *DNA* **7,** 261.

de Leeuw, W., Slagboom, P., and Vijg, J. (1989). Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Res.* **17,** 10137.

DiCesare, J., Grossman, B., Katz, E., Picozza, E., Ragusa, R., and Woudenberg, T. (1993). A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation. *BioTechniques* **15,** 152.

Diviacco, S., Norio, P., Sentilin, L., Menzo, S., Clementi, M., Biamonti, G., Riva, S., Falaschi, A., and Giacca, M. (1992). A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* **122,** 313.

Dodge, G. R., Kovalszky, I., Hassell, J. R., and Iozzo, R. V. (1990). Transforming growth factor β alters the expression of heparin sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **265,** 18023.

Farrell, R. E., and Greene, J. J. (1993). Regulation of *c-myc* and *c-Ha-ras* oncogene expression by cell shape. *J. Cell. Physiol.* **153,** 429.

Feroze-Merzoug, F., Berquin, I. M., Dey, J., and Chen, Y. Q. (2002). Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and β-actin in quantitative RNA analyses. *BioTechniques* **32,** 776.

Flohr, A. M., Hackenbeck, T., Schlueter, C., Rogalla, P., and Bullerdiek, J. (2003). DNase I treatment of cDNA first strands prevents RT-PCR amplification of contaminating DNA sequences. *BioTechniques* **35,** 920.

Förster, T. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **6,** 166.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys. (Leipzig)* **2,** 55.

Fronhoffs, S., Totzke, G., Stier, S., Wernert, N., Rothe, M., Brüning, T., Koch, B., Sachinidis, A., Vetter, H., and Ko, Y. (2002). A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **16,** 99.

Gaudette, M. F., and Crain, W. F. (1991). A simple method for quantifying specific mRNAs in small numbers of early mouse embryos. *Nucleic Acids Res.* **19,** 1879.

Gilliand, G. S., Perrin, S., Blanchard, K., and Bunn, H. F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87,** 2725.

Haendler, B., and Hofer, E. (1995). Characterization of the human cyclophilin gene and of related pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190,** 477.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10,** 413.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11,** 1026.

Horikoshi, T., Danenberg, K. D., and Stadlbauer, T. (1992). Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **52,** 108.

Ikonen, E., Manninen, T., Peltonen, L., and Syvänen, A. (1992). Quantitative determination of rare mRNA species by PCR and solid-phase minisequencing. *PCR Methods Applic.* **1,** 234.

Jensen, M. A., and Straus, N. (1993). Effect of PCR conditions on the formation of het-

eroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Applic.* **3,** 186.

Kinoshita, T., Imamura, J., Nagai, H., and Shimotohno, K. (1992). Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **206,** 231.

Krieg, P. A., and Melton, D. A. (1987). *In vitro* synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **155,** 397.

Lau, W. Y., Lai, P. B., Leung, M. F., Wong, N., Chen, G., Leung, T. W., and Liew, C. T. (2000). Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analyses. *Oncol. Res.* **12,** 59.

Lee, L. G., Connell, C. R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21,** 3761.

Leof, E. B., Proper, J. A., Getz, M. J., and Moses, H. I. (1986). Transforming growth factor type beta regulation of actin mRNA. *J. Cell Physiol.* **127,** 83.

Li, B., Sehajpal, P. K., Khanna, A., Vlassara, H., Cerami, A., Stenzel, K. H., and Suthanthiran, M. (1991). Differential regulation of transforming growth factor beta and interleukin 2 genes in human T cells: Demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* **174,** 1259.

Linton, J. P., Yen, J. J., Selby, E., Chen, Z., Chinsky, J. M., Liu, K., Kellems, R. E., and Crouse, G. F. (1989). Dual bidirectional promoters at the mouse *dhfr* locus: Cloning and characterization of two mRNA classes of the divergently transcribed Rep-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **9,** 3058.

Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Guisti, W., and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic.* **4,** 357.

Mansur, N., Meyer-Siegler, K., Wurzer, J., and Sirover, M. (1993). Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Res.* **21,** 993.

Murphy L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T., and Bates, S. E. (1990). *Biochemistry* **29,** 10351.

Oleary, K. A., Beck, T. W., and Kasper, C. B. (1994). NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase gene: Identification and characterization of the promoter region. *Biochem. Biophys.* **310,** 452.

Pernas-Alonso, R., Morelli, F., di Porzio, U., and Perrone-Capano, C. (1999). Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res. Protocols* **4,** 395.

Robert, C., McGraw, S., Massicotte, L., Pravetoni, M., Gandolfi, F., and Sirard, M-A. (2002). Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* **67,** 1465.

Ruano, G., and Kidd, K. K. (1992). Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods Applic.* **2,** 112.

Schneeberger, C., Speiser P., Kury, F., and Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Applic.* **4,** 234.

Siebert, P. D., and Larrick, J. W. (1992). Competitive PCR (product review) *Nature* **359,** 557.

Siebert, P. D., and Larrick, J. W. (1993). PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques* **14,** 244.

Smith, R. D., Brown, B., Ikonomi, P., and Schechter, A. N. (2003). Exogenous reference RNA for normalization of real-time quantitative PCR. *BioTechniques* **34,** 88.

Smith, R. D., Malley, J. D., and Schechter, A. N. (2000). Quantitative analysis of globin

gene induction in single human erythroleukemic cells. *Nucleic Acids Res.* **28,** 4998.

Solomon, D. H., O'Driscoll, K., Sosne, G., Weinstein, I. B., and Cayre, Y. E. (1991). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced regulation of protein kinase C gene expression during HL-60 cell differentiation. *Cell Growth Differentiation* **2,** 187.

Spanakis, E. (1993). Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res.* **16,** 3809.

Steen, A. M., Luthman, H., Hellgren, D., and Lambert, B. (1990). Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp. Cell Res.* **186,** 236.

Tepper, C. G., Pater, M. M., Pater, A., Xu, H., and Studzinski, P. (1992). Mitochondrial nucleic acids as internal standards for blot hybridization analyses. *Anal. Biochem.* **203,** 127.

Vanden Heuvel, J. P., Tyson, F. L., and Bell, D. A. (1993). Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *BioTechniques* **14,** 395.

Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **68,** 1015.

Wages, J. M., Jr., Dolenga, L., and Fowler, A. K. (1993). Eletrochemiluminescent detection and quantitation of PCR-amplified DNA. *Amplifications (PE)* **10,** 1.

Wang, A. M., Doyle, M. V., and Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86,** 9717.

Wang, S., Murtagh, J. J., Jr., Luo, C., and Martinez-Maldonado, M. (1993). Internal cRNA standards for quantitative Northern analysis. *BioTechniques* **14,** 935.

Wettwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* **22,** 130.

Wilkinson, T. E., Cheifetz, S., and DeGrandis, S. A. (1995). Development of competitive PCR and the QPCR System 5000 as a transcription-based screen. *PCR Methods Applic.* **4,** 363.

（金言译；刘望夷校）

第 21 章　转录差减法

21.1　基本原理

决定细胞和组织分化，直至赋予生物体各种表型的基因表达，在转录水平微妙有序地进行，犹如一曲优美的交响乐。比较两个或更多位置相近的不同细胞类型中，确定哪些基因都相同地表达了，而哪些基因表达是不同的，这是许多分子生物学家长期追求的目标。

文献中不断提到，把 RNA 作为基因表达的最佳指标。在聚合酶链反应（PCR）这一现在分子生物学家所用的主流工具出现以前，一种通常称为差减杂交的方法及各种类似的方法可用来去除两组 mRNA 和 cDNA 中的相同序列（Sargent 和 Dawid，1983；Hedrick 等，1984；Fornace 和 Mitchell，1986；Sargent，1987；Orr 等，1992；Lisitsyn 等，1993；Zhang 等，1995）。不同的表达产物使用物理方法分离开来，包括羟基磷灰石[1]层析（Bernardi，1971；Sargent，1987）、生物素标记结合链霉亲和素俘获和修饰的琼脂糖层析（Welcher 等，1986）、基于 PCR 的磁珠俘获方法（Sharma 等，1993）、生物素标记结合磁珠分离[2]（Rodriguez 和 Chader，1992；Lambert 和 Williamson，1993；López-Fernández 和 del Mazo，1993；Coche 等，1994）、生物素标记结合酚抽提（Travis 和 Sutcliffe，1988）、完整基因库的交叉杂交（Kulesh 等，1987；Cochran 等，1987）和不对称 PCR（Houge，1993）等。有趣的是，有时这些方法及其修改方法实际上在某些方面又回到了原来的方法。一般而言，每一方法都有它的不足之处，表现在效率或灵敏度等方面。目前还没有一种方法单独在细胞裂解时能很好地显示其基因的表达状况。

“差减”和“差减杂交”这两个术语代表一个整体的概念，即相对于一种特异的上调或下调的转录序列，以此来确定是否有基因表达的调节控制。这也是本书其他章节中讨论到的许多技术的基础。然而，差减杂交方法与用抗体进行的特异的和非特异的多聚体的免疫沉淀（第 6 章）是完全不同的。建立于核酸基础之上的差减法——核酸差减法吸引人之处在于其结果是得到一套与细胞表型变化部分相关或完全相关的序列。

如图 21.1 所示，用物理差减法从不同的转录分子中减去一套共同的序列，得到差异表

[1] 羟基磷灰石 $[Ca_5(PO_4)_3OH]_2$ 是磷酸钙的不溶解结晶。历史上被用于各种大分子（包括核酸）的纯化。这种介质的独特性质可以使单链核酸与双链核酸（cDNA：mRNA 和 DNA：DNA）分开。简而言之，在极低浓度磷酸盐缓冲液中单链核酸和双链核酸都能吸附在柱上。增加磷酸盐浓度时，低盐条件（0.12mol/L $Na_2H_2PO_4$，pH 6.8）可以洗下单链核酸，双链核酸则需高盐条件（直至 0.18mol/L $Na_2H_2PO_4$，pH 6.8）才能洗下。在 60℃时可以分得最清楚。羟基磷灰石也成功地应用于超螺旋 DNA 与线形分子的分离。

[2] 见第 7 章 poly(A)$^+$ mRNA 的磁珠纯化。其基本过程可以经过其中任一步修改后用于许多不同大分子的纯化。

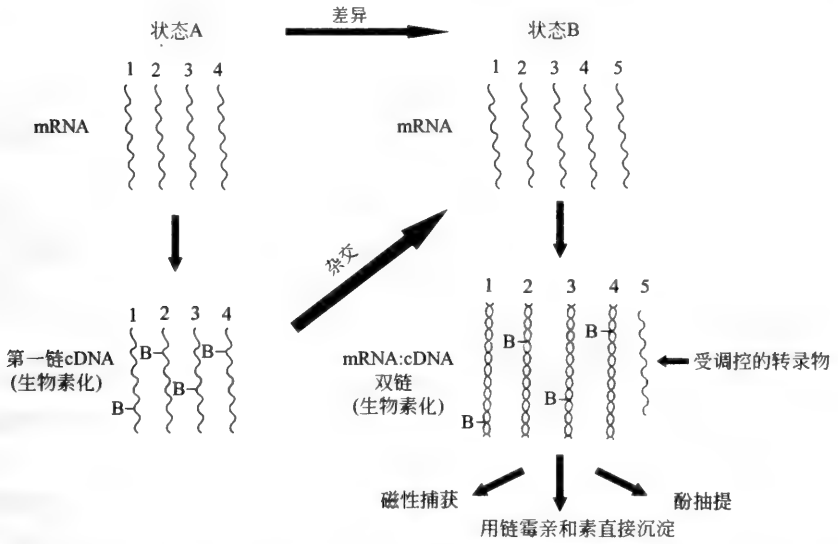


图 21.1　差减杂交鉴定差异表达序列的总体策略。状态 A 的 mRNA 被反转录成第一链 cDNA。用 Bio-21-dUTP 掺入法或光生物素化法，使这个过程中的翻译本，即 cDNA 生物素化。然后第一链 cDNA 被用作状态 A 细胞和状态 B 细胞正常转录 mRNA 的探针。生成的 RNA：cDNA 杂合体被用物理方法分离去除。同样的方法可以用于整个文库的筛选

达的分子的结果。这些分子，适用于克隆、限制性酶切图谱分析、测序和表达研究。虽然这些方法用得很多，通常它适于筛选那些中等到高丰度表达的差异序列，而对那些从抑制状态重新恢复表达的序列未必适用。将差减杂交与 PCR 联合使用，则表达丰度非常低的上调或下调的 mRNA 也能被检测出来。

一个实验就能区分共有的表达序列与受条件调节的表达序列，这是非常吸引人的。下面是一些近年来很多人在做的比较实验。

① 休止细胞与衰老细胞的比较。

② 前体细胞与终极分化细胞的比较。

③ 受感染细胞与未受感染细胞的比较。

④ 将某些能进行渗透调节的鱼从盐水移到淡水中其肾脏结构的改变。

⑤ 良性肿瘤与实体瘤的比较。

⑥ 双倍体细胞与建立的细胞株的比较。

⑦ 苹果与橘子（或桃子）的比较。

然后，比较实验可以在任何两组群体之间以任何原因进行，其结果是获得细胞从状态 A 到状态 B 时与变化相关的调节序列。

21.2　关键问题

不管具体的方法，一个从事分化表达工作的研究者，首先应该清楚地懂得一些对于所有的操作程序都用得到的术语和概念。

① 实验组（tester）也称目标组（target），其中包括要研究的被诱导的那些序列。驱动组（driver）是对照的或参考的序列，不包含那些被诱导的在实验结束时被查询的序列。

② 为了理解一个细胞在应答一个特别的实验处理过程中的生化改变，通常需要做第二次差减实验，此时，对调实验组和驱动组。换句话说，在正向差减中，从 A 组得到的cDNA是实验组，而 B 组 cDNA（或 mRNA）是驱动组。然而，在反向差减中，从 B 组得到的cDNA是实验组，而 A 组 cDNA（或 mRNA）是驱动组。这样有利于鉴定在设计的实验条件下诱导的和抑制的序列。

③ 差减杂交实验的实际操作过程中，驱动组的摩尔分子数量总是多于实验组的。这样可以确保第一轮杂交的动力学要求，使杂交能够完全去除两组共有的序列。在几小时后向杂交液中补加新鲜的驱动组样品常常是有帮助的。驱动组比实验组样品至少要过量 10 倍，通常两者使用量之比为 30∶1，甚至更多。

④ 如果操作得当，通过差减杂交，实验组中任何不能与驱动组互补的序列都能增多。

⑤ 差减法的总效率依赖于正向杂交动力学的效率和在整个过程中严格地维持此效率。这两点依赖于盐浓度、杂交温度、杂交时间和驱动组样品的持续过量存在。

⑥ 通常假定 PCR 有效，合成第一链 cDNA 的 PCR 引物设计合理，并且掌握好核酸化学知识，对有效差减实验而言，就不一定需要选择 RNA 的大小和 poly(A)$^+$了。

⑦ 如果用生物素标记 cDNA 或 RNA 也被称为是差减杂交设计一部分的话，那么可以在体外转录中使用生物素标记的核糖核苷三磷酸，在随机引物、缺口平移、PCR 中使用生物素化的脱氧核苷酸，或者在非酶标记中使用光活性的生物素。单独生物素标记的随机引物加 PCR 的方法在每一条链中生物素掺入量太少，而与生物素标记的脱氧核糖核苷三磷酸一起用于 PCR 的标记，可以得到足够的标记量。

⑧ 通常在驱动组样品过量的情况下，杂交时间越长，除去两组样品中相同序列的效率就越高。因而有利于富集单一的、诱导的序列。

⑨ PCR 差减分析的优点，还在于其片段可以如第 19 章所述用于 TA 克隆或 TOPO 克隆。

⑩ 所有差异表达的克隆必须用第二种甚至第三种方法进行筛选，进一步肯定实验结果的正确性。这些方法包括 Northern 分析（第 12 章）、核酸酶保护分析（第 16 章）、其他定量 PCR 方法（第 20 章、第 22 章、第 23 章）、修饰的 Southern 分析（Thomas 等，1994）等。要明白，单从差减得到的序列并不能肯定就是差异表达的目标基因。

⑪ 不立即使用的 cDNA 以乙醇沉淀的形式储存在－80℃，或以水溶液冰冻储存在－80℃。在第二条差减 cDNA 链合成后分装存储是明智的，避免反复冻融。

21.3 差减-校正 PCR

大多数鉴定差异表达基因的新方法都是以 PCR 为基础的。特别是核酸差减偶联校正 PCR（Siebert 等，1995）的方法，已经成为分离差异表达 mRNA 的常用方法。它的特点是以 PCR 为基础的分析，支持这一分析的单一接头的设计是这一系统（PCR-筛选 cDNA 差减系统；BD Biosciences）的关键。从图 21.2 可以看到，这个分析体系的结构有利于使差异表达的序列标准化，也即通过这个分析体系，不论在原始生物材料中丰度如何，得到的所有差异表达的序列浓度都差不多。这对于鉴定差异表达序列而言是很理想的，因为经常得到丰度高的序列而很难得到表达低的甚至未表达的 cDNA。因此，从标准化的亚 cDNA 库中测定 100 个克隆的序列，可以得到更完全的上调和下调的序列变化结果，与细胞内那些保留相对

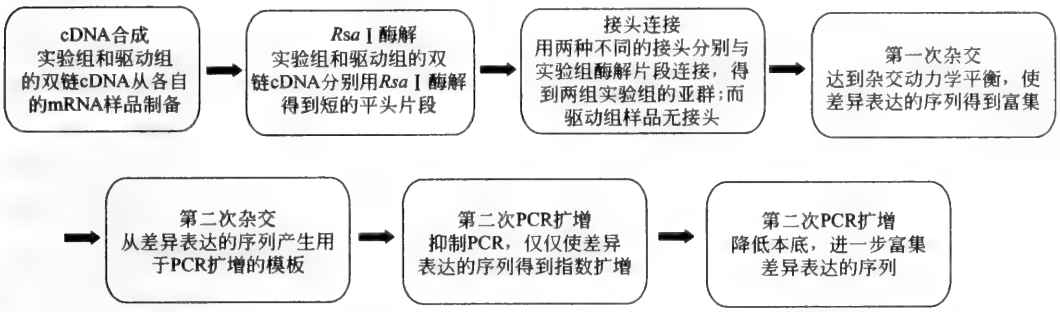


图 21.2　BD Biosciences Clontech 公司的 PCR-筛选 cDNA 差减系统（目录编号：637401）的概要

丰度的亚 cDNA 库相比有利得多了。

在实际应用中，PCR-筛选方法取得了很好的结果。虽然它在技术上比其他几种方法更具竞争力，而差减-校正 PCR 对大大富集低丰度转录本有利，从而比差异显示能产生更完全的基因表达情况。可以期待在丰度上差 5 倍的任何序列能够容易地通过差减而得到它们的序列，但是比驱动组样品小到 1.5 倍的基因，用 PCR-筛选方法仍有困难。

在图 21.3 中，简单解释了一种涉及两个实验组样品，用两种接头分别建立两组亚样品

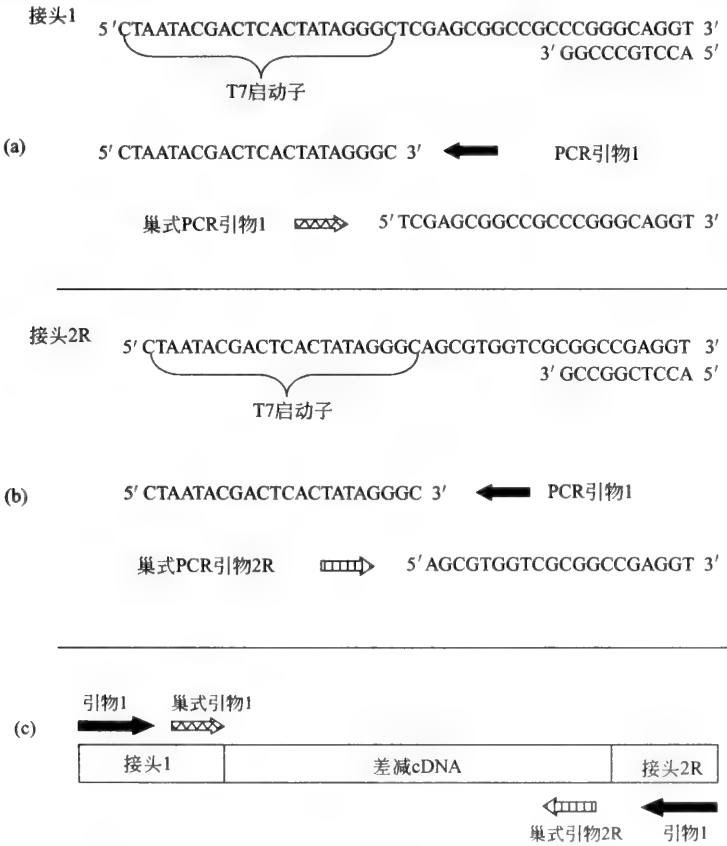


图 21.3　通过接头连接，制备用于杂交和 PCR 的实验组 cDNA。在进行正向差减和反向差减时，每一个实验组 cDNA 必须如图所示连接上合适的接头（BD Biosciences Clontech 惠赠）

组的做法。而驱动组仍然不连接接头。由于实验组 cDNA 是经限制性酶 *Rsa* Ⅰ切割的，*Rsa* Ⅰ识别 4 个碱基对的序列，产生的是平头，因此有利于接头的连接。这个方案的特点是接头 5′无磷酸基团。因此：①cDNA 是磷酸的供体；②接头中只有一条链与每一条 cDNA 链连接；③接头中相同序列的部分，在补齐反应后有利于引物的配对和后续的 PCR。

应用两次杂交和两套实验组样品适当混合的差减结果（图 21.4），从差异表达的序列产生出模板进行 cDNA 扩增。然后，用巢式引物进行第一组和第二组扩增，并且依靠 PCR 校正现象，得到的产物是富集了的相同量的差减序列（图 21.5）。经富集的差异表达序列进行克隆，继而证实其差减状态，并测序（图 21.6）。保证在第二次 PCR 扩增时要用巢式引物。这对于去除小片段垃圾并得到适量的对鉴定有用的较大的 cDNA 是绝对需要的。在笔者实验室，用第一次 PCR 扩增产物克隆差减 PCR 产物时，只能得到小的 DNA 片段，而未能克隆到有意义的大片段。

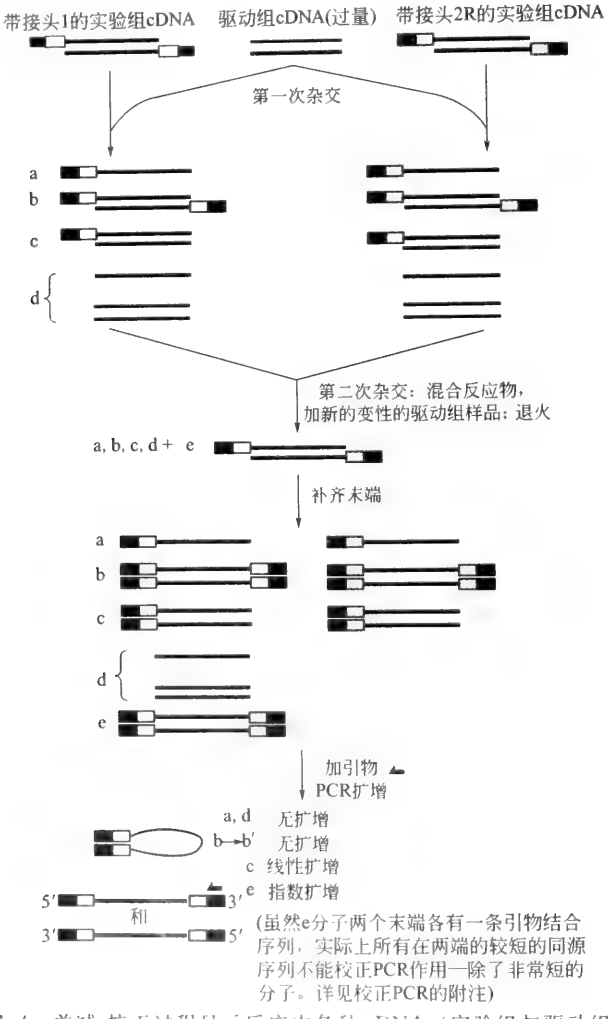


图 21.4 差减 校正过程显示反应中各种 cDNA（实验组与驱动组）如何相互作用。BD Biosciences Clontech 惠赠（PCR 筛选 cDNA 差减系统）

在差减 校正 PCR 方法中杂交是重要的，并分为两次；第一次杂交时间为 6～12h，第二次杂交可以过夜。第一次杂交超过 12h，单链的实验组分子可能在分子内或分子间形成碱基

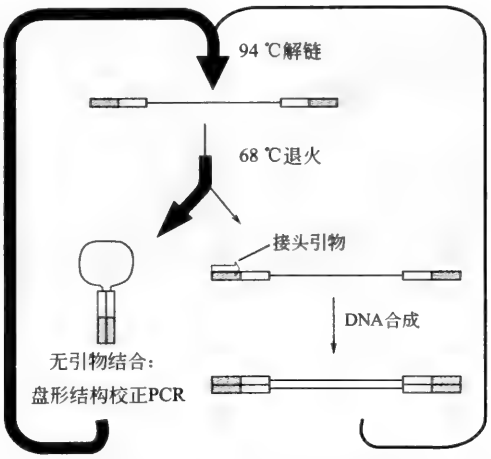


图 21.5　校正 PCR。PCR 过程中因非特异扩增形成盘形结构而受到有效抑制，而由不同接头开始的双链 DNA 的特异扩增能够顺利进行。BD Biosciences Clontech 惠赠

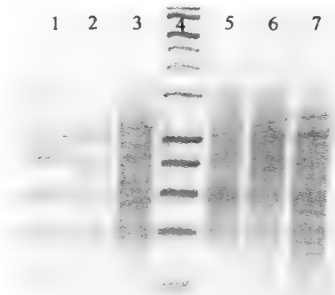


图 21.6　差减-校正 PCR 的典型结果。六个 RNA 样品在精确控制的条件下进行差异表达检测。对被测样品如“A”反应、“B”反应和“C”反应进行配对，然后进行正向（A—F 等）差减和反向（A—R 等）差减。差减的产物经 PCR 扩增。凝胶上每一条泳道中的条带是差异表达的序列，接着克隆，测序，并在进一步的实验中验证其差异表达。泳道 1，A 正向；泳道 2，A 反向；泳道 3，B 正向；泳道 4，分子量标准；泳道 5，B 反向；泳道 6，C 正向；泳道 7，C 反向

配对，从而影响第二次杂交时双链分子的形成。

差减-校正 PCR 过程临结束时，差减的 cDNA 被连接进质粒，再转化大肠杆菌。做好这一步，对得到个别的 cDNA 也是重要的。否则，对后面的进一步分析不利，因为质粒制备、测序都是费时和费钱的。可以用一个初步快速的筛选方法确定差异状态，包括原位杂交。先用一份标记的实验组探针进行原位杂交，再以一份标记的驱动组探针对复制-涂板克隆进行筛选。如果克隆相对较少（<500），一个有效的途径是用灭菌牙签挑取克隆并转到 96 孔板上，每个孔中含 200μl 灭菌的含 10%甘油及适当抗生素的 LB 培养液。37℃培养过夜后，用一个复制-涂板工具（图 21.7）将样品接种到新鲜琼脂糖平板上，这些克隆在相应的位置上生长，可以很容易地跟踪每一个克隆并与原先的孔对应。此外，在复制板上生长的克隆通常大于一般在标准涂板上生长的克隆。这些较大的克隆在杂交时对探针产生明确的信号。那些由实验组探针而不是驱动组探针显示的克隆，即是预期的差异表达克隆。此时，可以将各个克隆制备成质粒并测序。如果克隆是生长在含有甘油培养基的 96 孔板上，这些板可以用蜡

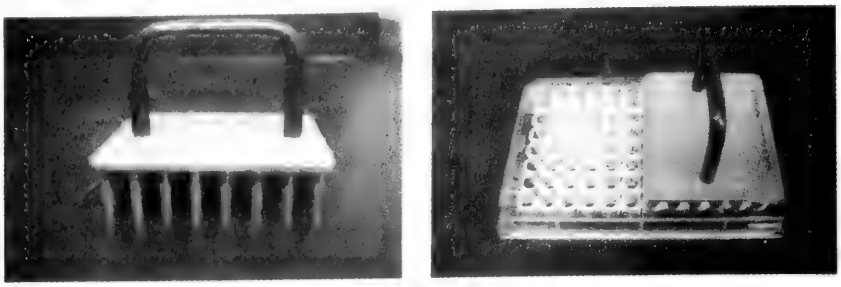


图 21.7　细菌克隆复制 涂板工具。精确配合 96 孔板的带 48 齿的不锈钢叉子，插入 96 孔板上已经生长有个别克隆的 48 个孔内（通常每孔 200μl）。钢叉齿蘸上菌液后，轻轻印到 1.5%的琼脂糖平板上（含有适当的抗生素）培养。克隆在平板上长成非常规则的几何形状，具有相当大的可用于杂交的区域。依靠几何形状和强的杂交信号，很容易从 96 孔板上获得阳性克隆。96 孔板也有利于克隆的构建和储存

膜封起来并存储在－80℃。较长一段时间后克隆仍具有活力。

虽然差减-校正 PCR 方法需要熟练的技能，与其他方法相比也相对费时间，但其优点也是非常突出的。

21.4　非 PCR 差减

目前，最常用的富集诱导序列的方法都是以杂交为基础，其关键是除去两种细胞之间的共同序列。这些方法中不少又是与以 PCR 为基础的扩增联合进行的。如前所述，通过限制非目的序列的扩增，而进一步富集诱导的序列。另一个可以得到相同实验结果的方法，虽然在捕捉诱导序列的方法上不同，但也是以杂交为基础的。最后，PCR 也可以用于扩增的目的。其他方法如随机引物法，也可用于制备差减 cDNA，并进行克隆，也可用于建立差减 cDNA 库或直接用作异源核酸探针。

通过比较两种细胞来鉴定差异表达序列而非 PCR 的一个直接方法，是利用生物素与链霉亲和素之间很强的亲和力，然后用很简单的酚/氯仿抽提来实现（图 21.8）。简要的过程是：用光活化生物素标记过量的驱动组 mRNA，然后与实验组的 cDNA 杂交。杂交后的样品中带生物素的分子包括未杂交的过剩的 mRNA 和杂交的 cDNA：mRNA 杂合双链，然后与链霉亲和素结合，并用有机溶剂酚/氯仿抽提除去。诱导出的 cDNA 则留在水相中，随后用乙醇沉淀纯化。

光活化生物素标记是极为简单的经常使用的方法。将光活化生物素与要标记的样品（DNA、RNA 或蛋白质）混合，并用高功率白光灯（理想的波长在 350～370nm）进行照射即可。生物素标记的 RNA 应当是新鲜标记的并且随后立即使用，而生物素标记的 DNA 或蛋白质样品则很稳定，可以在－20℃储存数月。光活化生物素标记是非常可靠的标记方法，在经常使用的情况下，每 2～3 个月标记一次就可以了。

杂交通常在非常严谨的条件下进行 24h，有时长达 48h。杂交结束后样品要很快稀释以防止出现任何不正确的杂交。加入链霉亲和素，由于它与生物素的高亲和性，因而可以结合所有生物素标记的未杂交的驱动组 mRNA 以及杂交中形成的 cDNA：mRNA 杂合双链。酚/氯仿抽提去除生物素与链霉亲和素结合的复合物，最后，通过乙醇沉淀得到诱导的特异表达的 cDNA。

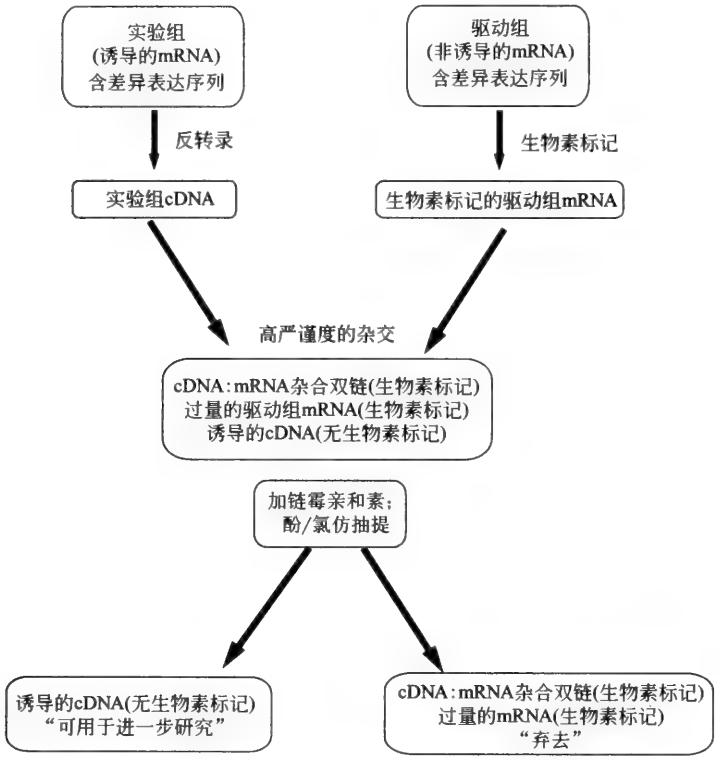


图 21.8　使用生物素标记的驱动组样品及酚/氯仿抽提法进行差减杂交

21.5　差减法的问题与解决办法

(1) 必须做到的

① 高质量 RNA

- 使用质量好的无 RNase 技术。
- 用硫氰酸胍或盐酸胍作为裂解缓冲液[1]。
- 用酸性酚抽提。
- 用胍盐缓冲液进行二次沉淀。
- 样品用无 RNase 的 DNase 处理。
- 用 DEPC 处理的水配制 70%乙醇，用此 70%乙醇充分洗涤 RNA 沉淀，以去除过量的盐[2]。
- 恰当储存纯化的 RNA[3]。

② 反转录成 cDNA 及 PCR

- 每个 cDNA 反应要用相同的 RNA 量 (200～300ng)。
- 重申要使用无内源 RNase H 活性的酶制剂。
- 避免使用依赖 Mn^{2+} 的反转录酶。

---

[1] NP-40 裂解液也可以用，但要制备重复性好的纯 RNA 需要更熟练的技能。

[2] 阳离子会定量地结合 dNTP，可对 cDNA 合成或 PCR 造成极大影响。

[3] 差减杂交法比其他许多应用 PCR 的方法更不能容忍部分降解的 mRNA。

- 使用 cDNA 反应总混合液。
- 使用 PCR 总混合液。
- 使用热启动 PCR 方法，理想的是使用混合酶以保证反应的高反应性、高专一性、高保真性和可重复性。

(2) 一般问题

① 一条或几条泳道严重拖尾

- 优化 Mg^{2+} 浓度（一般不需要）。
- 减少 PCR 循环数。
- 减少反应中的酶量。
- 稍稍增加退火温度。

② 无产物

- 检查起始 RNA 的完整性。
- 在 cDNA 合成反应中加 RNA 酶抑制剂（RNasin）。
- 分析 RT 和 PCR 的组分，特别是酶的质量。
- 做必需的对照反应。
- 核对反应中的每一个组分，并确认所有组分已经充分混合。
- 检查 PCR 的反应参数。

③ 低产率

- 样品匀浆或裂解不完全是可能的原因。
- 检查最终的 RNA 沉淀是否溶解完全。
- 测 A_{260}/A_{280}，如比值小于 1.65 表明有蛋白质或其他杂质污染。
- 检查 RNA 的降解。
- 从动物取出的组织样品没有立即处理或冰冻。
- 纯化的 RNA 储存在－20℃，而不是在－80℃。
- 水溶液与反应管没有经过消除 RNase 的处理。

④ DNA 污染

- 如果样品没有经 DNase 处理则会受到 DNA 的污染。

⑤ 数据重复性不好

- 使用薄壁 200μl 反应管反应，调整 PCR 的反应参数。
- 采用热启动 PCR（见第 19 章）。
- 对每一个细胞样品配制单个、大体积的反应总混合物，再分到各个反应管中。
- 使正向引物、反向引物配对的 T_m 更加接近。
- 使用能合成长 PCR 产物的酶（$T_{aq}+P_{wo}$）。
- 不用矿物油，而采用有热盖的热循环仪。
- 用不同方法抽提的 RNA 会出现这种情况。
- 不是同一天抽提的 RNA 可能出现这种情况。
- 检查细胞或组织的状态　如果细胞处于不同的细胞周期或者是从不同状态下分离的组织，数据可能重复性差。
- 优化热循环反应，并在同一个热循环仪上进行反应（不仅仅是同样型号的仪器）。

(3) 一般建议

- 变性步骤时间愈短愈好。
- 变性温度最好低至 90～92℃。
- 延伸温度可以降到 68℃。
- 每个循环的时间可适当加长（5～20s/循环）。
- 精确取样对于结果的重现性是至关重要的，在实验开始时及一段间隔后应对微量取样器重新校正。准备备用取样器，在取样过程中更换取样器可避免带入气溶胶污染。
- 在细胞培养液中加入亚细胞毒浓度（10 ng/ml）的环己酰亚胺（放线菌酮），培养 4～6h 后裂解细胞，丰度很低的 mRNA 可被高度诱导。此时，蛋白质翻译过程受抑制，成熟 mRNA 在细胞质中积累。然而，对有些细胞特别是正常的二倍体细胞，这种处理是不能忍受的。
- 与许多 PCR 的技术不同，转录差减过程对于起始材料的质量要求特别高。质量最好的 RNA 通常用含胍的缓冲液提取。
- 使用含有必备引物的试剂盒可以不必订购或自己制备引物。
- 对微量离心管进行硅烷化，不论对于 DNA 还是 mRNA 都可以减少其在管壁的疏水黏附而减少损失。这种做法在处理非常少量的、不易再得到的样品时尤其有好处（见附录 8 的操作步骤）。

21.6　参考文献

Bernardi, G. (1971). Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite columns. *Methods Enzymol.* **21,** 95.

Coche, T., Dewez, M., and Beckers, M. C. (1994). Generation of an unlimited supply of subtracted probe using magnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Res.* **22,** 1322.

Cochran, B. H., Zumstein, P., Zullo, J., Rollins, J., Mercola, M., and Stiles, C. D. (1987). Differential colony hybridization: Molecular cloning from a zero data base. *Methods Enzymol.* **147,** 64.

Fornace, A. J., and Mitchell, J. B. (1986). Induction of B2 RNA polymerase III transcription by heat shock: Enrichment for heat shock induced sequences in rodent cells by hybridization subtraction. *Nucleic Acids Res.* **14,** 5793.

Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., and Davisw, M. M. (1984). Isolation of cDNA clones encoding T-cell specific membrane-associated proteins. *Nature* **308,** 149.

Houge, G. (1993). Simplified construction of a subtracted cDNA library using asymmetric PCR. *PCR Methods Applic.* **2,** 204.

Kulesh, D. A., Clive, D. R., Zarlenga, D. S., and Greene, J. J. (1987). Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84,** 8453.

Lambert, K. N., and Williamson, V. M. (1993). DNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Res.* **21,** 775.

Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259,** 946.

López-Fernández, L. A., and del Mazo, J. (1993). Construction of subtractive cDNA libraries from limited amounts of mRNA and multiple cycles of subtraction. *BioTechniques* **15,** 654.

Orr, S. L., Gese, E., and Hood, L. (1992). A new approach to understanding T cell development: The isolation and characterization of immature $CD4^-$, $CD8^-$, $CD3^-$ T cell

cDNAs by subtraction cloning. *Mol. Biol. Cell* **3,** 761.

Rodriguez, I. R., and Chader, G. J. (1992). A novel method for the isolation of tissue-specific genes. *Nucleic Acids Res.* **20,** 3528.

Sargent, T. D. (1987). Isolation of differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* **152,** 423.

Sargent, T. D., and Dawid, I. B. (1983). Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* **222,** 135.

Sharma, P., Lönneborg, A., and Stougaard, P. (1993). PCR-based construction of subtractive cDNA library using magnetic beads. *BioTechniques* **15,** 610.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23,** 1087.

Thomas, M. G., Hesse, S. A. Al-Mahdawi, S., Bui, T. D., Moniz, C. F., and Farzaneh, F. (1994). Procedure of second-round differential screening of cDNA libraries. *BioTechniques* **16,** 229.

Travis, G. H., and Sutcliffe, J. G. (1988). Phenol emulsion-enhanced DNA-driven subtractive cDNA cloning: Isolation of low-abundance monkey cortex-specific mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85,** 1696.

Welcher, A. A., Torres, A. R., and Ward, D. C. (1986). Selective enrichment of specific DNA, cDNA, and RNA sequences using biotinylated probes, avidin, and copper-chelate agarose. *Nucleic Acids Res.* **14,** 10027.

Zhang, M., Zou, Z., Maass, N., and Sager, R. (1995). Differential expression of elafin in human normal mammary epithelial cells and carcinomas is regulated at the transcriptional level. *Cancer Res.* **55,** 2537.

（陆长德译；刘望夷　金言校）

第 22 章　mRNA 差异显示[1]

22.1　基本原理

如何能够获得克隆并鉴定两个或更多样品之间差异表达的基因，无疑是科学研究中十分重要的问题。由于细胞表型是基因表达调控的最终表现，因此关注一个细胞的 mRNA 表达谱，以及在不同实验条件下其复杂性和组成的相应变化，是合乎逻辑的。

前面章节中讨论到，转录差减和校正 PCR 作为一种已经十分成熟的方法，能够通过与对照或基本条件下的样品比较，得到在一定条件下的一组样品转录产物的表达差异。这一章的关注点，是用另一途径来实现相同的目的。简而言之，这一方法就是将互补 DNA（cDNA）的合成与聚合酶链反应（PCR）为基础的扩增相结合，使用大量的短引物组合，通过在聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）中的条带比较，来鉴定出一组或更多实验样品中组分的差别。当使用相同的引物组时，从相同组分的 RNA 扩增出的 PCR 产物在凝胶电泳的相邻泳道中将得到相同大小的条带。更为重要的是，这一方法能够清晰地辨认出在相邻泳道中同一位置上缺失或丰度不同的条带。

这个方法在此后又不断有所改变，并有一些不同的命名。其中最科学描述这一方法的术语，可能就是 mRNA 差异显示（Liang 和 Pardee，1992），也就是本章的标题。然而，用得更多的且被立即认同的是“差异显示 PCR”，可以简称为 DDPCR[2] 或更繁琐的 DDRTPCR（Bauer 等，1993）。另一个名称，侧重描述这个策略在引物上微妙的设计特点，称为 RNA 指纹图谱和 RNA 任意引发 PCR（RNA arbitrarily primed PCR，RAP-PCR）（Welsh 等，1992；McClelland 和 Welsh，1994）。虽然这些技术方法都略有不同，并且对于得到的转录产物的复杂性进行分析，其结果的完整性和复杂的程度也有些差别，但所得的基本结果都是相同的。而有些方法则是原先技术的改进（Liang 等，1992；Liang 等，1993；Mon 等，1994；Liang 等，1995；Zhao 等，1995）。本章中为简单起见，将这一方法称为差异显示 PCR（DDPCR）。

22.2　一般过程

DDPCR 最重要的是依靠 PCR 的速度、特异性和灵敏度，通过 PCR 从细胞产生的一系

---

[1] mRNA 差异显示过程专利权属于 GenHunter 公司（Nashville，TN）。同时，GenHunter 公司也是唯一授权可以出售差异显示 PCR 试剂盒的公司。请访问 www.genhunter.com 以获得更多的信息。

[2] 当使用缩写时注意使用大写字母，另一缩写 ddPCR 则用于代表双脱氧测序 PCR。

列不同的转录产物中扩增出 cDNA 来。其他过程是简单的，从纯化的 RNA 合成 cDNA，以及 cDNA 第一链产物的扩增。与传统的 cDNA 合成不同的是，DDPCR 对每一个样品要进行几个 cDNA 的合成反应。每一反应是由一组特定的下游引物和上游引物的组合来进行的，任何一个反应管中所有 PCR 产物中只有一组产物得到扩增。简而言之，DDPCR 是一种卓越超群的多重的反转录聚合酶链反应（RT-PCR）法。随后，反应产物通过电泳分析与其他样品直接进行比较（例如，对照组与处理组）。总之，这些步骤组成了一个可以同时检查所有转录序列的规范的方法。DDPCR 的主要步骤如下。

① RNA 分离。用 DDPCR 鉴定调控的序列，首先需要分离高质量的 RNA。应用 DDPCR 方法时，使用胍盐-酸性酚抽提纯化 RNA 是一种广泛应用的较好的方法。研究者可以参考第 5 章、第 6 章的步骤，或者使用商品化的含胍试剂来完成 RNA 的分离。DDPCR 方法的优点和缺点见表 22.1。其优点是只需要加入少量 RNA。然而，最好是由同一研究者在同一天从同一材料一次性纯化较大量的 RNA，并以乙醇沉淀的形式储存，这样可以真正确保有较多量相同的模板，当需要重复实验时可以得到有重复性的数据。此外，选择 poly $(A)^+$ RNA 是不必需的，也不推荐如此做，原因有以下四个。

a. 选择 poly$(A)^+$ RNA 对于 cDNA 第一链的合成没有特异性。

b. 选择 poly$(A)^+$ RNA 可能实际上会丢失某些模板，因而不能代表那些丰度低的（稀少）的转录物。

c. 样品可能会有 poly(dT) 污染。

d. poly$(A)^+$ RNA 选择的另一个问题是，可能引入 RNase 的污染，因而降低样品的可用性。

表 22.1　差异显示 PCR 方法的优点和缺点

优点
• 反应快速简单
• 对检出专一的转录产物非常灵敏
• 这一方法是通用的、半定量的
• 这是鉴定差异基因表达的一种系统方法
• 不需要也不推荐用 poly$(A)^+$ RNA
• 同时显示了上调和下调的基因
• 需要微克级的 RNA(通常少于 3μg)
• 数据有可重复性
缺点
• 由于低严谨度而产生高的假阳性率(达 20%～40%)
• 需要极高纯度的 RNA
• 反应对污染尤其是基因组 DNA 污染非常敏感
• 再扩增后仍能观察到假阳性
• 已知序列在电泳凝胶上的位置不能预料
• PCR 产物未进一步确认，用作探针还需最佳化
• 对于一对样品要进行完全的对比分析，需要进行大量的 PCR
• 需要许多 PCR 试剂
• 纯化的 cDNA 经常有无关的 cDNA 序列的污染
• 转录产物 3′端对应的序列都能被扩增
• 此技术对模板的质量等影响因素高度敏感，这些对于标准 PCR 并不是主要问题
• 数据的重复性有时会出现问题

最后极重要的是，需要用 DNase 处理，以除去样品中所有痕量的基因组 DNA。引物能够与任何互补的 DNA 或 RNA 进行碱基互补配对。DNA 去除的效率可以通过无反转录的对照反应来验证。这将在后面讨论。

② cDNA 下游引物的设计。用于 DDPCR 分析的 cDNA 合成的标准步骤是，对每一份 RNA 样品进行几个 cDNA 合成反应。在任一反应管中，仅将所有可能的 mRNA 中的一部分反转录成 cDNA。这样，每一个反转录反应将产生几个亚组的 cDNA，在电泳中表现为多个离散的条带，而不是连续弥散的一片。使用有以下通用结构的下游锚定引物就可以得到上述结果。

5′TTTTTTTTTTV

或

5′TTTTTTTTTTVV

其中，V＝A、C 或 G。

3′-核苷酸的兼并可以确保所有可能的 mRNA 被反转录；此外，3′-核苷酸的锚定确保引物与 poly(A)$^+$尾的最 5′端配对。这样在实际的 cDNA 合成反应中就不会在反转录 poly(A) 尾上花费宝贵的时间，如用一条 oligo(dT) 作引物（5′TTTTTTTTTTTTT），它可以与 poly(A) 尾的任何部位配对，有时甚至离转录产物的编码部分几百个核苷酸远。

有两种常用的适合于设计下游引物的方法。一组 cDNA 产生的基础是下游引物识别位于 mRNA 的 poly(A) 尾前面的一个或两个碱基。第一种方法是下游引物的通用结构为标准的 oligo（dT）的 3′端加一个附加的核苷酸（Liang 等，1994），例如 T_{12} V（5′TTTTTTTTTTTTV，其中 V＝A、C 或 G)。这样对应三个下游引物的不同的反转录反应将产生三组不同的 cDNA，每一组约含有全部可能的 cDNA 的 1/3。单核苷酸锚定方法的优点是这些引物可以简化鉴定的过程。第二种方法中下游引物的通用结构是 T_{11} VV（5′TTTTTTTTTTVV，其中 V＝A、C 或 G)。下游引物的 3′末端有两个兼并核苷酸，这样引物就可以与 3′末端为 3′A(A)$_n$BB（其中 B 是互补于 V 的）的 RNA 转录产物进行退火并合成 cDNA。许多经常使用 DDPCR 方法的研究者认为，使用 3′端有两个兼并核苷酸的下游引物，得到的 PCR 产物更具有代表性，即反映了所有 mRNA 的全部状态，并且这一方法的重复性也很好。

所有二核苷酸组合共有 4^2 种可能性，也就是 16 种，在引物 3′端的排列有：

AA	CA	GA	TA
AC	CC	GC	TC
AG	CG	GG	TG
AT	CT	GT	TT

立即可以去除末端为 TT 的引物，由于这一引物没有专一性，任何有 poly(A) 尾的 RNA 都可以与此引物配对，并反转录产生不适于这一方法的连续弥散的 cDNA❶。另外 3′端为 TA、TC 或 TG 的三个引物也可以去除，实际上它们与在 3′端只有一个兼并核苷酸的引物 T_{11}TV 结构相同。最后，许多研究者报道了 3′端为 AT、CT 或 GT 的下游引物在使用

❶ 引物 T_{11}TT 就是 oligo（dT），可以在使用 PCR 建库的过程中用来产生 cDNA，要想通过 PCR 扩增得到库就需要精心选择上游引物。

时会产生许多低分子量的弥散。这可能是因为这些引物在某种程度上容易引起错误引导[1]。同时，含有以下序列的 mRNA 也将被反转录成为 cDNA 第一链。

5′…ACAAAAAAAAAAAAAAAAAA3′

5′…AGAAAAAAAAAAAAAAAAAA3′

5′…AUAAAAAAAAAAAAAAAAAA3′

由于这个原因带有 AT、CT 或 GT 的引物可用或可不用，这取决于使用者的经验。因此在设计一个实验时，研究者应当计划用以下两组引物组进行 9 个或 12 个不同 cDNA 合成反应。

AA	CA	GA		AA	CA	GA
AC	CC	GC	或	AC	CC	GC
AG	CG	GG		AG	CG	GG
				AT	CT	GT

笔者实验室成功地应用了以下 9 条下游引物：

5′TTTTTTTTTTTAA

5′TTTTTTTTTTTAC

5′TTTTTTTTTTTAG

5′TTTTTTTTTTTCA

5′TTTTTTTTTTTCC

5′TTTTTTTTTTTCG

5′TTTTTTTTTTTGA

5′TTTTTTTTTTTGC

5′TTTTTTTTTTTGG

如果经过仔细的分析，需要使用带 3′端 AT、CT 或 GT 二核苷酸的下游引物，当然也可以加进引物中去。此外，也可以在下游引物的 5′端设计带有某些类型的锚定序列（启动子序列、限制性酶切位点、其他克隆位点），以使 DDPCR 产物在合成后更易进一步操作。

③ cDNA 合成。在 mRNA 差异显示中，对 RNA 的首次酶处理就是用反转录酶进行的第一条 cDNA 链的合成。这个反应可以用任何一种广泛应用的 cDNA 合成体系。为方便研究人员的使用，第一链合成试剂作为整个系统的一部分，可以从 GenHunter 购买。由于 RNA 固有的不稳定性，每次 cDNA 合成仅使用少量 RNA。并且根据这一反应的特性，应当使用 RNase H⁻ 的反转录酶（详见第 18 章）。此外，在进行 DDPCR 时，应当避免使用被用得愈来愈多，并且在许多其他应用中表现极好的一步法 RT-PCR 系统。最重要的一点是能够合成最长的 cDNA。如果合成第一链的效率不高，则较短的第一链产物可能不能与上游引物进行碱基配对，因而这些序列将得不到 PCR 扩增。

④ 上游引物设计。上游引物的设计不像下游引物那么有明显的结构特点。笔者实验室使用了 24 个半随机的 10 聚体作为上游引物进行差异显示并取得了成功，最近报道使用 13 聚体的上游引物可取得更好的重复性。对于上游引物，笔者认为更应当称为是“半特异”的，由于它并不是有效的、必需的或完全的，即并没有使用 4^{10} 种组合（对 10 聚体）或 4^{13} 种组合（对 13 聚体）作为上游引物。最初的文献在“材料与方法”中，充斥着放弃无用引

[1] 引物除了 3′端核苷酸外，其他地方的错配还是可以容忍的。cDNA 的合成、PCR 及其他分子生物学技术，都需要 3′末端与带有 3′-OH 底物的核苷酸与模板碱基配对

物的教训“……合理设计上游引物……”等，这意味着上游引物既不是随机选择的，也不是兼并序列的大杂烩。实际上最经常使用的引物是有平均的（G+C）含量（通常 50%）且不会形成引物分子内配对及引物间二聚体。在相对不严谨的引物退火条件下，实际上上游引物中仅有 7～8 个碱基与模板配对。虽然开始时这种相对不严谨的配对不太稳定，但仍是 DDPCR 的必要步骤，目的就是使自然界产生的任何信息都能够得到扩增。

下面是一些合理设计的上游引物的例子：

5′GATCATAGCC	5′CTGCTTGATG
5′GATCCAGTAC	5′GATCGCATTG
5′AAACTCCGTC	5′TGGTAAAGGG
5′GATCATGGTC	5′TTTTGGCTCC
5′GTTTTCGCAG	5′TACCTAAGCG
5′GATCTGACAC	5′GATCTAACCG
5′TGGATTGGTC	5′TCGGTCATAG
5′GGAACCAATC	5′GATCTGACTG
5′GATCAATCGC	5′TCGATACAGG
5′TACAACGAGG	5′GATCAAGTCC
5′GATCTCAGAC	5′GGTACTAAGG
5′GATCACGTAC	5′CTTTCTACCC

这些上游引物可以用于 cDNA 第二链的合成，并可以与下游引物共同作用进行对称 PCR 使 cDNA 得到扩增。

⑤ 第一轮 PCR 扩增。如前所述，这一步将有大量的 PCR 要进行，如 9 个下游引物×24 个上游引物×2 种不同的 cDNA 库。其实同时进行所有反应是不必要的，最好是将 9 个 cDNA 合成反应中的 8 个储存在－80℃，一次仅使用一个进行 PCR 扩增。如果在 DDPCR 的第一个样品中已出现目的条带，可以对这些条带进一步探索，剩下的 cDNA 合成反应可以在以后再研究。

a. 反应情况。DDPCR 的循环情况与标准的对称 PCR 扩增在循环数和退火温度上有所不同，DDPCR 往往需要进行 40 个循环，然后于 72℃进行引物延伸 5～10min。当需要扩增丰度非常低的 RNA（第 7 章），为了使其达到可检测的水平，就需要增加循环数。在进行 DDPCR 时，要根据每个反应管中的上游引物和下游引物来确定反应的参数；同时，还要顾及反应中错配的容忍度，并保证所有的 cDNA 第一链都能够进行 PCR 扩增。此外，并不是所有的设备都适于进行 DDPCR。循环参数的设定往往需要进行摸索，并且对于每一台不同的热循环仪都要通过经验判断设定反应的参数。以下循环的程序可供参考：

起始的解链	94℃	3min	
循环参数	94℃	20s	40 个循环
	40℃	30s	
	72℃	30s	
最终的延伸	72℃	5min	
保存	4℃		

b. 矿物油。在进行 DDPCR 时，要避免使用老式的使用矿物油的热循环仪。在此大力推荐使用有热盖的热循环仪，如 PE/Applied Biosystems Model 9700 或其他已授权的热循环

仪❶，进行这一反应。矿物油的使用常常使条带数量减少并明显影响条带模式的重复性，这对于本技术而言是灾难性的结果。如果在实验室中没有带热盖的热循环仪，最好到其他处借用此仪器进行实验。

c. 混合酶。一种被称为长距离 PCR 的强有力的技术，发展了结合两种酶的活性来产生非常长的并具有很高保真性的 PCR 产物。笔者实验室在 DDPCR 中很成功地应用了此技术。虽然在差异显示中应用这些酶并非要产生和基因组那样长的 PCR 产物，但两个不同的热稳定酶协同工作的效率可以使相对丰度非常低的 mRNA 得到扩增（否则这些序列可能不能被检测到）。

简而言之，混合酶通常由 *Taq* 聚合酶与某些其他热稳定聚合酶组成。可以使用多种不同的酶组合，一个常用的例子是 *Taq* 聚合酶与 *Pwo* 聚合酶的组合（表 22.2）。*Taq* 聚合酶缺少校对活性（3′→5′核酸外切酶）并能产生长度达 2～3kb 的 PCR 产物，它是高度进行性的酶。*Pwo* 聚合酶有校对活性，可以使 *Taq* 聚合酶出错的频率减少为原来的几分之一。两个酶在一个反应管内作用，可以克服由 *Taq* 聚合酶单独使用时对 PCR 产物长度的限制，同时又具有高的保真性。因为 *Pwo* 聚合酶有更高的稳定性，它可以在 *Taq* 聚合酶热失活后继续合成产物。这样就可以使稀少的在可检测水平以下的 cDNA 得到扩增。而且由于混合酶的校对功能，从测序得到的数据也更加可靠。

表 22.2　热稳定混合酶的协同作用

项　　目	*Taq* 聚合酶	*Pwo* 聚合酶
半衰期	95℃ 45min	95℃ 2h 以上
5′→3′聚合酶活性	+++	+
5′→3′核酸外切酶活性	+	−
3′→5′核酸外切酶活性(校对活性)	−	+
来源	*Thermus aquaticus*	*Pyrococcus woesei*

d. 恰当的对照。确定数据的可靠性是极为重要的，对于一个像 DDPCR 这样可能产生错误的技术，设置合适的对照更有必要。

第一，只要是进行 RNA 的反转录反应，就应该同时进行无反转录酶（RT⁻）的对照反应。没有产物产生，表明在制备 RNA 的过程中没有基因组 DNA 污染。如果在对照反应中有 PCR 产物，研究者必须在进行下一步反应前用 DNase（无 RNase 的 DNase Ⅰ）处理样品。根据获得 RNA 的不同方法，在分离过程中使用 DNase 自动地处理所有的 RNA 样品，这与抽提得到 RNA 后再用 DNase 处理样品并进行沉淀相比，可以节省大量的时间。研究者应当假定所有 RNA 样品都含有基因组 DNA 污染，即使是经氯化铯密度梯度离心纯化得到的样品也是如此，都要用无 RNase 的 DNase Ⅰ处理。

第二，进行一个只用一条引物的对照反应，确定引物不会自引发反应。另一个有用的方法是用激酶标记下游引物的 5′端，这样，只有由上游引物和一个标记的下游引物产生的产物可以从放射自显影中看到，而由上游引物单独产生的 PCR 产物是观察不到的。

第三，一个简单的确定差异扩增产物真实性的方法，是对同样的样品用两个浓度进行分析。在同一 RNA 样品的两个浓度的反应中都有的条带，而在各种浓度的其他样品中都没有

❶ 要索取已授权的热循环仪的产品目录，可以与以下地址联系 PE Applied Biosystems, Director of Licensing, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404, 电话：650 570 6667。

的条带是真正的阳性结果，可以用于进一步的研究。这个步骤可以避免花许多时间来研究是否是人为的假阳性结果（即由取样或电泳上样误差造成的信号强度的差别）。

第四，可以鉴定在同一块凝胶上进行电泳的一组反应的内部标记（即那些在每次实验中都在凝胶同一位置出现的丰度极高的序列）。电泳凝胶用 X 射线片曝光很短时间，仅使信号强的条带显影而信号弱的条带不显影。这是一种得到一个反应的“指纹图谱”的好方法，也是一种检查一组样品分析效率的方法，因为这些丰度高的“路标”序列在每次重复实验中都应显现❶。从这一水平上讲，DDPCR 至少是半定量的❷，反映了 RNA 起始样品的复杂性：电泳上信号的强度与合成 PCR 产物所需模板的丰度成正比。

e. 预实验。一般而言，DDPCR 本身有不少困难，因而最好能够做一个预实验，或至少进行一组预反应，然后再对不能替代的样品进行大量的实验。一个经常考虑的关键问题是反应的重复性。由于反应结果与引物的性质有关，热启动 PCR 是有帮助的。

⑥ 第一轮 PCR 产物的分析。在 DDPCR 过程中，第一轮 PCR 结果出来时是令人激动的时刻，即将可以看到与基因调节有关的甚至可能发现以前从未观察到的序列。对结果的观察方面，虽然其他方法也可以令人满意地观察到种种 PCR 产物，但是放射自显影还是一种最为合适的方法，它可以清晰地显示出你想看到的结果。下面列出的是一些用于观察 DDPCR 产物的方法，其灵敏度从高到低：荧光标记❸ [^{35}S]dATP，[^{33}P]dATP，银染，SYBR 绿Ⅰ，溴化乙锭。

荧光标记的灵敏度与^{35}S 和^{33}P 放射性标记相同，由于其在工作时危害性更小，因而应当优先考虑。银染虽然其灵敏度不如本文大力推荐的放射性标记的方法，但也被成功地应用于 DDPCR 中鉴定调节的序列（Lohman 等，1995）。染料 SYBR 绿Ⅰ可以方便地用于显示高丰度和中丰度的产物，有时也能观察到表达的差别。溴化乙锭仅可以用来显示反应正常进行，因此可以先用少量样品进行 3%琼脂糖凝胶电泳，用染料 SYBR 绿或溴化乙锭染色初步确定后，再将 DDPCR 产物在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析。

文献报道，除了普遍使用变性胶（6%丙烯酰胺，8.3mol/L 尿素）分析 DDPCR 产物外，非变性胶也得到了成功的应用。如果确有需要，DDPCR 后可以先进行真空离心浓缩不超过 10min，再上样电泳，这种处理对灵敏度和条带清晰程度影响不大。但是要尽量避免使用这种真空浓缩的方法，因为它会导致不同样品之间体积的差异。如果用非变性胶不能产生容易辨别的条带，可以再进行标准的 DNA 测序胶电泳。通常电泳采用恒定功率 50W 的条件，直到溴酚蓝到达胶的底部。然后将凝胶在 Whatman 滤纸上进行真空干燥（80℃，2h），并用 X 射线片曝光过夜。至于回收目的条带，最佳的策略是同时压两张 X 射线片，第一张作为实验记录保留，第二张片子覆盖到重新浸润准备回收的胶上用于条带的回收。为确保回收的片段无误，回收后的胶再抽干进行第三次曝光来确定 DNA 条带确已被切除。最后，从非变性胶中回收 cDNA 进行再扩增就很容易了。从变性胶中回收的 cDNA 要透析过夜以除去尿素，再经过乙醇沉淀，才可以用于再扩增；而从非变性胶回收的凝胶条带可以直接用于 PCR 再扩增。

---

❶ 这与 2D 凝胶电泳的肽图中的内部标记相似。

❷ 在定量方面 DDPCR 是有局限的，因此对于由这一技术得到的数据，最好现实些认为它是半定量的。其后的分析，包括核酸酶保护（第 16 章）和竞争 PCR（第 20 章）则是更加定量地测定基因表达的变化。

❸ 荧光差异显示（FDD）试剂盒（RNAspectra kits）可以从 GenHunter 公司购买。

⑦ 第二轮 PCR 扩增——再扩增。在确认差异表达的 DNA 已经从第一轮凝胶上回收后，就需要进行再扩增以进行进一步的鉴定。第二轮 PCR 的循环参数应与第一轮的相同，产物的大小可以用琼脂糖凝胶（2%～3%）电泳鉴定。

聚丙烯酰胺凝胶切片通常置于 100μl 灭菌水中 30～60min，这段时间中将有足够的 DNA 被浸出。上述浸胶的水溶液可以用于第二轮 PCR，作为再扩增的模板。如果在扩增时有问题出现，可尝试减少浸泡胶条的水用量并在 90℃保温 10min。虽然有些操作步骤建议在水中煮沸胶条，但这种操作常常使实际可用模板量比在 90℃保温 10min 的大大减少。也可以增加引物浓度 2～5 倍，或者将胶条粉碎以助于回收目的 DNA。此外，用不受调节变化的 cDNA 进行再扩增的练习，有利于使再扩增系统流程化。

22.3 产物的多样性：预期得到什么

表型改变无疑涉及一些基因，其中有些一定是差异表达的。DDPCR 的主要优点是能同时显示细胞在裂解时的所有转录产物。PCR 的快速和灵敏性有利于在较短时间内检测出丰度非常低的转录产物。这里最重要的一点是，虽然研究者在进行随后鉴定以前对基因差异表达的序列毫无所知，但基因表达的差别的确可以以 PCR 产物的形式表现出来。

典型的 DDPCR 可产生大小在 50～800bp 的有用的产物，有时也会得到超过 1kb 的序列。在凝胶电泳时，DDPCR 产物就可以显现出它们的丰度，可能为高丰度的、低丰度的或位于中间不同程度的丰度。当溴酚蓝从聚丙烯酰胺凝胶的顶部泳动到底部，没有掺入的核苷酸已电泳出胶，大小在 700～800bp 的产物通常能够分开，而产物大于 800bp 的信号则有压缩。有时将上样量加倍，可以使大分子量的产物看得更清楚，这一方法在 DNA 测序中十分常用。这尤其适用于用混合酶扩增的 PCR 产物。

要明确显示得到的数据中的最有意义的结果，就要将使用相同下游引物得到的 PCR 产物在同一块凝胶上进行电泳。状态 A 的 PCR 产物与状态 B 的 PCR 产物在电泳时应按照上游引物的使用顺序排列在邻近泳道中。表 22.3 显示了上样时排列的一个例子。这样的排列就可以直接在胶上并排地比较每一对反应的产物。当细胞在状态 A 和状态 B 中表达相同的转录产物时，在相邻的两个泳道中就可以观察到相同分子量的产物（图 22.1）；而在相邻的泳道没有出现相应的条带，则可能是差异表达的基因序列（图 22.2）。使用 DNA 测序的 48 孔梳齿，可以方便地将使用同一下游引物的所有上游引物组合的样品上样在同一块凝胶上（即 2 种细胞样品×1 个下游引物×24 个上游引物）。第一轮 PCR 扩增是为了显示出调节的序列，因此在分析产物时不需要加入分子量标记。在第二轮筛选中才需要标准的分子量标记。

表 22.3 差异显示 PCR 的上样策略

泳道	cDNA 来源	下游引物	上游引物	泳道	cDNA 来源	下游引物	上游引物
1	状态 A	3	1	7	状态 A	3	4
2	状态 B	3	1	8	状态 B	3	4
3	状态 A	3	2	9	状态 A	3	5
4	状态 B	3	2	10	状态 B	3	5
5	状态 A	3	3	11～48	相同的策略		
6	状态 B	3	3				

注：相同引物组合产生的 PCR 产物上样在相邻的泳道中，这样就可以并排地直接比较它们 cDNA 扩增产物之间的差异。邻近泳道中相同分子量的条带，对应于在两种细胞类型中都转录的序列。邻近泳道中某条带在强度上有差别及在其中一条泳道中完全缺失则表示特异基因的差异调节。标准大小的 DNA 测序胶具有极好的分辨率，并且 48 孔梳齿允许两种细胞样品、同一下游引物的所有上游引物组合的样品能够全部上样到一块凝胶上。

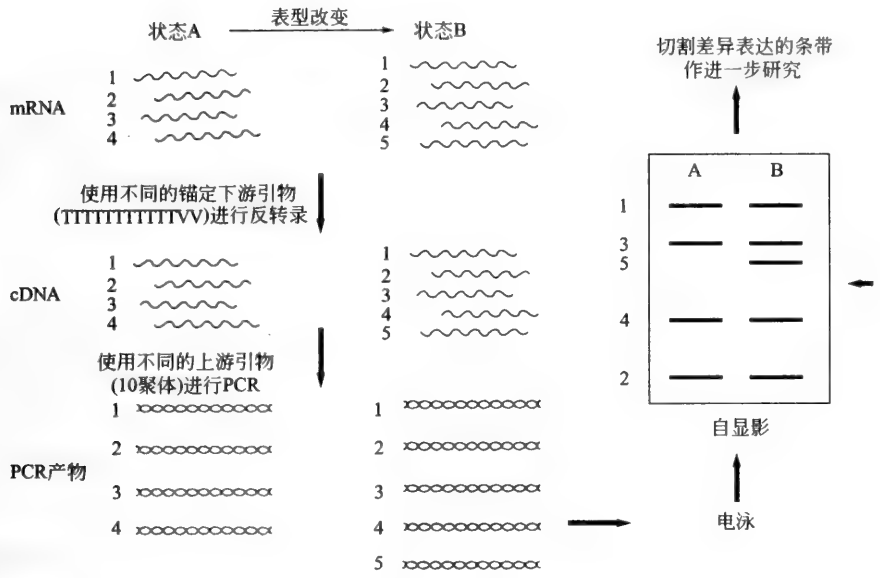


图 22.1　mRNA 差异显示的一般方法。当使用相同的引物组合时，两种细胞都产生的转录产物得到相同的 PCR 产物，仅在一个样品中出现的 PCR 产物说明此相应基因是差异转录的

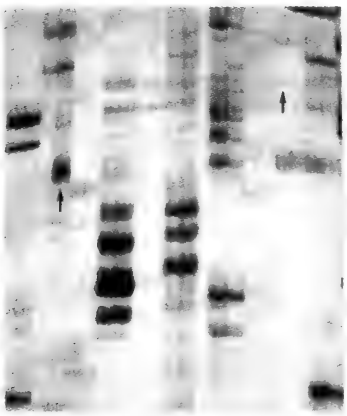


图 22.2　信使 RNA（mRNA）差异显示。第一轮扩增的差异显示 PCR（DDPCR）产物经电泳和自显影后的典型结果。在邻近泳道中相同的条带表示都转录的基因。仅在一个泳道中显示出来的条带很可能是差异表达的序列，因而可以作为进一步研究的对象。值得注意的是，每对不同的产物信号强度还直接反映了相应转录产物的相对丰度

用于差异显示的 RNA 通常是用胍盐-酸性酚抽提制备的。对于从各种生物材料中制备 RNA，该方法是非常合适的。然而用这种试剂从细胞质中得到的 mRNA 中混有未经剪接的 hnRNA。因此，PCR 产物测序结果显示的既有外显子序列也有内含子序列。而且，相应于同一转录产物的两个不同大小的 cDNA 会在同一块胶上显示出来。这是由于一个特定转录本的所有分子都可以经相同的下游引物反转录后产生 cDNA。两个或多个上游引物（在不同反应管中）可以在 cDNA 上找到各自的互补位点而支持 PCR 扩增。虽然这会有点令人沮丧，但是这一现象正好显示了此方法可以使任何转录产物都得到最大可能的扩增。

22.4 实验方案：mRNA 差异显示

进行 mRNA 差异显示的实验方案有很多种，它们都有其自己的策略。GenHunter DDPCR 产品也称 RNAimage 系统，含有必要的引物和进行实验所需的试剂。下列方法是基于使用如上所述 DDPCR 下游引物和上游引物的方法，它是系统的和详尽的方法，研究者可以在整个流程中几个点上暂时中止工作，而不会降低灵敏度和分辨率。

22.4.1 cDNA 的合成

① 确保用于合成 cDNA 第一链的 RNA 是高质量的。这可以用一个小型的凝胶电泳来检查，胶上应当能清晰看到 28S 和 18S 核糖体 RNA（rRNA）的条带，在 18S rRNA 下面有少量弥散。在进行反应前，用无菌水将 RNA 溶解并稀释到浓度为 100ng/μl，置于冰上。最好在使用前再将 RNA 从乙醇沉淀中重新溶解。

② 制备 cDNA 合成总混合液（足够做 18 个反应的）：

38.0μl　10×第一链合成缓冲液（100mmol/L Tris，500mmol/L KCl，pH 8.3）

76.0μl　25mmol/L $MgCl_2$

9.5μl　10mmol/L dNTP 混合液

19.0μl　RNA 酶抑制剂（50U/μl）

13.3μl　水

15.2μl　AMV 反转录酶

置冰上。

注意　所需体积取决于所用下游引物的数量和每个反应的重复数量，可相应增减。

③ 将一组用于反转录的微量离心管标上样品名。为方便可将 A 细胞的 RNA 样品标为 A1～A9，B 细胞的 RNA 样品标为 B1～B9。每管加 3.0μl 25μmol/L 的下游引物储存液（每管只加一种引物）。

④ 在 A1～A9 管中各加入 3.0μl（300ng）A 细胞样品 RNA，在 B1～B9 管中各加入 3.0μl（300ng）B 细胞样品 RNA。

⑤ 每管中各加入 5.0μl DEPC 处理的水。

⑥ 70℃水浴 10min，立即置冰上。

⑦ 短暂离心，将样品集中到管底。

⑧ 每管各加入 9.0μl cDNA 合成总混合液（第②步）。

⑨ 42℃保温 1h 合成 cDNA。

注意　MMLV 反转录酶适用于合成较长的 cDNA。如使用 MMLV 酶，37℃保温 1h（应使用 MMLV 第一链反应缓冲液）。

⑩ 95℃加热 5min 使反转录酶失活，马上使用的 cDNA 样品可以置冰上保存。其他 cDNA样品离心集中到管底并储存于－80℃。

注意　未加热使反转录酶失活将影响后续的实验结果，新合成的 cDNA 储存不当将影响其稳定性。

22.4.2 通过 PCR 扩增 cDNA 的各个组分

在 cDNA 合成结束后，样品可以直接用于 PCR 扩增。对应于一条下游引物有许多上游

引物要进行 PCR 扩增反应，因此同时对一条以上的下游引物进行操作是不合理的。从合成的 cDNA 反应中选取一个，并将其他样品冻存起来。再次扩增时正确吸取溶液的体积是十分重要的。如果选用放射自显影作为检测的方法，在反应总混合液中必须包括 [α-^{33}P] dCTP(10mCi/ml) 或 [α-^{35}S]dATP。

① 配制如下 DDPCR 反应总混合液（足够进行 48 个反应）：

100.0μl	10×PCR 缓冲液（无 $MgCl_2$）
120.0μl	25mmol/L $MgCl_2$
5.0μl	[^{35}S]dATP(10 mCi/ml)
10.0μl	500μmol/L dNTP
10.0μl	*Taq* 聚合酶
361.0μl	DEPC 处理的水

注意 1　应该先配制一个大体积的不含 *Taq* 聚合酶和放射性标记化合物的总混合液。其体积可以根据 cDNA 合成反应的数量按比例进行调整。这一总混合液应适当分管并储存在－20℃。

注意 2　反应的最佳 $MgCl_2$ 浓度为 3mmol/L。

注意 3　要扩增大于 450bp 的 PCR 产物，dNTP 浓度可以从 5μmol/L 增加到 15μmol/L。

② 加入 108μl 下游引物（与前面的 cDNA 合成反应使用相同的引物）到反应总混合液中。

③ 将反应总混合液分装到两个不同的反应管中，一份用于 A 细胞的 cDNA，另一份用于 B 细胞的 cDNA。

④ 向上述反应总混合液中分别加入 A 细胞和 B 细胞的 cDNA 合成反应液，使预混合液分别含有 A 细胞和 B 细胞的 cDNA。

⑤ 在 24 个微量反应管中各加入 15μl 上述①～④步得到的 A、B 预混合液。

⑥ 每个反应管中加入 5μl 上游引物（每管只加一种上游引物）。

⑦ 短暂离心，将所有组分集中到管底。

⑧ 如果使用无热盖的热循环仪（不推荐使用），每个反应中加入 20μl 矿物油覆盖样品。否则跳过此步。

⑨ 扩增步骤：

94℃	3min	
94℃	30s	40 个循环
40℃	60s	
72℃	60s	
72℃	5min	
4℃	∞	

22.4.3　PCR 产物分析

毫无疑问，对 PCR 产物最佳的分析方法，就是使用 PAGE 的方法。但不一定要进行变性聚丙烯酰胺凝胶（含尿素）电泳，在大多数情况下非变性胶也可以使用。

(1) 可选步骤：初步分析

要确定一组 DDPCR 样品的相对效率，则可以从每一个反应中取一些样品在 1× Tris-硼

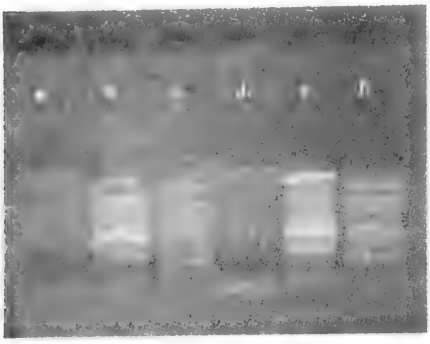


图 22.3 差异显示 PCR。产物在第一轮扩增后电泳并用 EB 染色。取 6 个样品进行 3% 琼脂糖凝胶（其中含 1μg/ml EB）电泳。这一分析可用于初步判定反应的效率。值得注意的是即使使用这种不灵敏的方法，仍可以观察到某些样品间的差别

酸盐-EDTA（TBE）缓冲液或 1×Tris-乙酸盐-EDTA(TAE) 缓冲液中进行 3%琼脂糖凝胶电泳，然后用 SYBR 绿、SYBR 金或溴化乙锭染色。用 100V 电泳 20min，从凝胶上应能观察到 DDPCR 产物（图 22.3）。如果观察不到任何东西就意味着反应效率很低，并且需要曝光较长时间才能看到条带。用荧光染料染色虽然是一种灵敏度不高的方法，但是反应成功时往往可以显示出来。

① 将 3.0g 琼脂糖加入 105 ml 1×TAE 缓冲液中溶化，可制成两块 12cm×14cm 的凝胶，每块含两排上样孔。

当心 这种高浓度的琼脂糖凝胶很易过热并会暴沸，处理时要小心。

② 高浓度凝胶凝聚很快，因此凝胶煮沸后使其冷却时不要等太久。如果使用溴化乙锭染色，则直接在热的凝胶中加入 20μl 10mg/ml EB 并制胶。如果使用 SYBR 金或 SYBR 绿Ⅰ，则不加入染料先制胶，电泳后再进行 SYBR 染色。

③ 每个 DDPCR 取少于 5μl 的样品，加入 1μl 凝胶上样缓冲液。为吸取方便，在加入凝胶上样缓冲液后每 5μl DDPCR 样品可以加入 5～10μl 水。

④ 100V 电压下电泳，直到染料进胶 2～3cm。

⑤ 含有 EB 的凝胶电泳后可以直接在紫外灯下观察。使用 SYBR 绿Ⅰ染色时，将凝胶浸没于 2×SYBR 绿Ⅰ的 1×TAE 缓冲液中，15min 后观察。浸泡的时间长可增强微弱条带的着色。然后进行拍照。

当心 使用紫外灯、致畸变的荧光染料及放射性物质都要按规定注意安全。

(2) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

制备非变性的和变性的聚丙烯酰胺凝胶需要有经验，因为丙烯酰胺单体有一定的神经毒性。除非你的实验室可以正确处理这种试剂，否则最好还是购买预制好的凝胶，它含有所有的成分并有适用于各种电泳装置的规格。常规使用的是 6%聚丙烯酰胺凝胶，在 1×TBE 缓冲液中电泳。

非变性聚丙烯酰胺凝胶在分析 DDPCR 产物时通常表现很好。如果在泳道中一直出现弥散现象，则可改用变性聚丙烯酰胺凝胶。

① 带好手套。小心拆开预制胶，用蒸馏水冲洗加样孔。应始终带着手套，不要以为已聚合的胶对健康无害。

② 装好电泳装置，将凝胶装入。

③ 预电泳 20～30min。

④ 将一半 DDPCR 反应物（10μl）转到新的离心管，加 10μl 非变性凝胶上样缓冲液（0.2%溴酚蓝；10mmol/L EDTA，pH8.0；20% Ficoll），剩余的 10μl 样品储存在－80℃备用。

⑤ 与上样缓冲液混合后，每个样品取 5μl 上样到凝胶加样孔中。

⑥ 恒功率不超过 50～60W 进行电泳，直到溴酚蓝泳动到凝胶底部。

⑦ 从电泳槽小心取出凝胶。将凝胶放到一张 Whatman 滤纸上，80℃抽干 2h。不要用甲醇-醋酸固定凝胶。

当心　牢记 DDPCR 含有放射性，会污染凝胶盒和电泳缓冲液。要按放射性处理要求小心处理污染的设备和试剂。

⑧ 放射自显影，至少过夜。

注意　最好压两张 X 射线片，即使第一张在切割条带的过程中损坏，仍然还有第二张可以保留。

⑨ 冲洗片子，检查是否有差异表达的序列存在。

注意　在此技术中，分析数据和对目的条带的鉴定是费时的一个部分。一些高质量的图像分析软件可以对凝胶的图像进行数字化处理，并挑选出那些清楚地存在于一个样品而在另一个样品中缺少的条带，并且还能区分一对条带中的一个与另一个在量上的差别，例如存在 5 倍或更多的诱导或抑制。

22.5　实验方案：差异表达序列的鉴定和筛选

正如前文所建议的，使用非变性胶分析 DDPCR 的结果要比传统的变性胶好。由于变性胶的分辨效率极高，在非变性胶上的一条条带，往往在变性胶上出现两条甚至更多的条带。原因包括：①DNA 链的解开；②*Taq* 聚合酶在 PCR 产物的 3′端加上一个核苷酸（通常为 A）[1]。因此，自显影的复杂性给回收条带带来了困难。

① 依据自显影在滤纸（胶）上切割目的条带，分别放入不同的离心管中，加入 100μl 灭菌水。

② 室温放置 30min 后，90℃加热 10min，然后离心使胶与滤纸集中到管底。

③ 小心将上清液转移到新的离心管中，其中含有浸洗出的 DNA。

④ 使用与得到这条条带的第一轮扩增中相同的上游引物和下游引物再扩增。

25.0μl	浸出的 DNA（第③步的上清液）
5.0μl	10×PCR 缓冲液（无 $MgCl_2$）
6.0μl	25mmol/L $MgCl_2$
5.0μl	500μmol/L dNTP
5.0μl	2μmol/L 下游引物（从 25μmol/L 储备液稀释）
5.0μl	2μmol/L 上游引物
1.0μl	*Taq* 聚合酶（5U/μl）

注意　重扩增遇到困难时可将 $MgCl_2$ 浓度调整到 1.5mmol/L，两种引物浓度增加到 1μmol/L，并且循环数增加到 40 个循环。

⑤ 使用最初生成起始产物所用的相同条件再扩增浸出的 DNA。

起始的解链	94℃	3min	
循环参数	94℃	30s	30 个循环
	40℃	60s	
	72℃	60s	
最终的延伸	72℃	5min	
保存	4℃		

[1] 当单独使用具有校对活性的热稳定聚合酶，或与 *Taq* 聚合酶共同使用时，不会在 3′末端加上多余的单个核苷酸。

⑥ 在第二轮扩增结束后，取出 10μl 样品与 2μl 上样缓冲液混合，在 2.5%琼脂糖凝胶（1×TBE 或 1×TAE）上与分子量标准（如 Promega PCR Marker，Cat. No. G-3161）同时电泳。

⑦ 用 SYBR 绿或 EB 染色并拍照。

22.6 用亲和俘获回收差异表达的序列

鉴定了差异调节的基因，虽然是十分重要的结果，但经过了扩增与再扩增得到的 DDPCR 产物并不一定是同一种产物。例如在进行 Northern 分析时，如果将一个未纯化的 DDPCR 产物用作核酸探针，能够检测出多个条带并不罕见。即使是再扩增后单一的条带也常常“隐藏”着两种或更多的不同的 cDNA（Callard 等，1994）。它们之间仅仅末端序列即引物识别的序列是相同的。除非将这些产物分离开来，否则不能确保随后得到的数据的可靠性。

在进行 Northern 分析时，探针序列碱基配对于支持最初反转录 cDNA 的全长 RNA。如果探针不止一个，则每一个探针将与各自的全长 RNA 杂交。更有甚者，在对 DDPCR 产物进行验证时，如果在 Northern 分析中使用细胞总 RNA 作为靶材料，就可以观察到同一转录产物未剪接的、前体形式的多条条带。

分离 DDPCR 产物有两种标准的方法。首先，如后面将讨论的，研究者可以直接将序列克隆到一个适用于下游实验的载体中。直接连接虽然看似简单，但也不失为一个好方法。然而，在某些情况下也可以使用 DDPCR 条带（含一个或几个序列）作探针进行 Northern 分析。简单地说，取相同的或至少相近量的用于进行 DDPCR 实验的 RNA 进行标准的变性电泳，随后印迹到一张尼龙膜上（如第 12 章所述）。DDPCR 再扩增的产物进行标记（放射性标记或化学荧光标记）并用作 Northern 分析的探针。这一方法是基于 DDPCR 产生的cDNA 两条链中的一条可以与最初产生 cDNA 的 RNA 碱基配对。如果有不止一条 cDNA，它们将分别与各自相应的 RNA 转录物碱基配对。在检测时，杂交信号将显示出杂交探针的位置。此外，在一条泳道上得到一定强度的信号（如状态 A RNA），而在邻近泳道（如状态 B RNA）无杂交信号，则它确实是差异调节序列非常有力的证据。

使用这一方法是省时的，然而许多通过 PCR 获得的 cDNA，其 RNA 转录产物的量大都处于以传统的 Northern 分析方法可检出的水平之下，即使经过 poly(A)$^+$ 选择也是如此。

因此，如何分离或俘获得到的不同 cDNA 呢？对 Northern 分析中显现的信号，根据 X 射线片上的位置将含有杂交到 cDNA 条带的尼龙膜的相应区域切下，回收每条可见条带。这一小片尼龙膜含有固定化的 RNA 和通过氢键结合的 cDNA 探针，将此尼龙膜放入离心管，加 100μl 灭菌水，95℃加热 5min，在此条件下 cDNA 将从滤纸上被洗脱下来。管中的水可以用来制备 PCR 混合物，从其中可以得到：①丢失的那条链，即可以合成 cDNA 的第二链；②可以扩增得到单一的产物用于进一步鉴定。这一方法被称为亲和俘获，也被称为反向 Northern 印迹（Zhang 等，1996）。这一方法不仅可以从混合物中分离特定长度的序列，也可用于确定纯化 cDNA 的不同状态。

22.7 PCR 产物的克隆

任何其他克隆 PCR 产物的方法，在这里通常也同样适用。将片段插入一个载体，是另一种可以将 DDPCR 产生的混合 cDNA（同样大小、不同序列）分开的一种方法。现在最常

用的一种克隆方法是 TA 克隆，在此方法中以 A 为尾巴的 PCR 产物可以与以 T 为尾巴的载体相连接；另一种是 TOPO 克隆，利用 DNA 拓扑异构酶 I 的“再结合”活性，快速将 PCR 片段与载体相连接（第 19 章）。

PCR 产物的克隆虽然不是绝对必要的，但有利于测序和扩增这些克隆。由于有时不止一个片段被连入载体，经转化后涂布在选择性培养基上，随后挑出的单个细菌菌落只含有一个插入片段。为了鉴定一个菌落是否确为转化子，可用灭菌牙签随机挑选 10 个（根据自己情况可变）菌落接种到新鲜的琼脂平板上保存菌种，并加到 PCR 反应混合液中，这一反应混合液中含有产生 DDPCR 产物时所用的相同的上游引物和下游引物。在进行琼脂糖凝胶电泳分析时，应当产生一条与插入片段相同大小的条带。

22.8　差异表达的验证

在 DDPCR 进行完所有引物的组合后，可以进行第二次反应，这次反应使用的是那些在第一次反应中显示出差别的引物对。这种方法在某种程度上有利于消除假阳性。当然，应当尽可能与第一次反应的实验条件一致，从而使实验能够得到可重复性的结果。然而人们不能期望两次实验的结果会完全重现，那是因为：①对于细胞培养条件不可能完全重复（基因的表达依赖于细胞密度、细胞分裂代数、培养基等）；②来源于不同病人的组织样本是完全不同的生化组织，虽然有许多相似性，但仍有许多不同。为了使对同一样本的不同反应得到最大的重复性，研究者应当在最初分离 RNA 的过程中就将 RNA 分为几管，从而使 RNA 沉淀在几个管之中，只取其中一管进行离心并用作合成 cDNA 的模板。在完成所有 DDPCR 的步骤后，研究者可以另取一份由同一个人在同一天分离的 RNA 样品，能够精确地代表细胞相同的生化状态。

目前有四种可靠的方法，可用来判断使用差异表达法得到的差异表达序列是否在细胞内真的有变化，即 Northern 分析（第 12 章）、核糖核酸酶保护分析（RPA）（第 16 章）、核逃逸实验（第 17 章）和单链构象多态性（SSCP）（Orita 等，1989）。SSCP 是一种简单的技术，其原理是单链 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶中的泳动依赖于分子的核苷酸组成，有关此方法的综述和实验流程见 Fujita 和 Silver（1995）。

22.9　进一步的鉴定

Northern 分析、核糖核酸酶保护分析（RPA）和核逃逸实验，可被用于进一步鉴定一个已经纯化的 cDNA 基因的转录情况。这些方法虽然从观察基因表达的角度上讲是极佳的，但对鉴定基因却无能为力。对一个已知的 DNA 序列，鉴定其克隆也就是轻而易举的事了。考虑到 DDPCR 产生的序列相对比较短，因而花费大量的时间和精力去建立限制性图谱也许是不太值得的，克隆测序后即可得知其限制性酶切位点的分布。

用于 DDPCR 的引物对于标准的测序而言太短了。为了方便对 DDPCR 的产物进行测序，可以在再扩增时使用加长的引物。在引物的 5′端可加上 T3 或 SP6 等测序启动子序列，或者在引物上设计一个限制性酶切位点也是特别方便的。这样用于再扩增的引物将是 A′和 B′，而不是原来的 A 和 B 了，DDPCR 产物将可以直接用于测序（Reeves 等，1995；Wang 和 Feuerstein，1995）。

差异调节序列的分离为更清楚地了解细胞中基因的调控提供了很多可能性。分离的 DNA 序列可以重复再扩增，作为核酸探针其来源将不受限制，合成探针时需要加入 [α-^{32}P] dNTP，通常仅进行 15 个循环，结束后再在 72℃ 延伸 5min 即可。探针序列可用于对以前尚未测定的 RNA 样品进行基因表达分析或从库中筛选更多的基因及旁侧的调节元件。

22.10 差异显示的应用

事实上只要实验操作能够引起细胞的生化改变，这一模型就适用于应用 DDPCR 技术进行研究。mRNA 差异显示能够对不同来源的 mRNA 进行并排比较，并能成功地鉴定出上调和下调的基因。下面列出一些用于研究基因调控的例子（当然不仅限于这些研究）。

① 培养细胞中药理浓度的生长因子或药物的影响。

② 静止细胞、衰老细胞及对数生长期的培养细胞的比较。

③ 蔬菜水果中基因功能随季节的变化。

④ 对外源基因转染的应答。

⑤ 用于诊断的新指标。

⑥ 分化过程中功能的研究。

⑦ 分离多基因家族的新成员。

⑧ 辨别转录调控与转录后调控序列（涉及的 RNA 制备方法参见第 3 章中图 3.2）。

差异显示方法有代表性的研究应用可参见 Sager 等（1993）、Zimmerman 和 Schultz (1994)、Zhang 等（1996）。

22.11 mRNA 差异显示的问题与解决方法

许多使用 DDPCR 方法的研究者，都发现这一方法的主要缺陷是反应的重复性差以及有许多种可能的解释。这个方法的特点就是对引物的质量非常敏感。只有经过 HPLC 纯化的引物才能很好地参与反应。由于需要进行质量控制，对于第一次使用这一方法的研究者，建议购买 DDPCR 的试剂盒，因为要合成优化的均一的高质量引物并非一般设备条件能够达到。

这一方法的另一个特点就是 DDPCR 对反应的所有成分的浓度都非常灵敏，因此在合成 cDNA 和进行 PCR 时，准确取样并使用反应总混合液是十分关键的。以下列出的几点将有利于减少问题的出现，并最大程度地提高实验的重复性和效率。

(1) 必须做到的

① 高质量 RNA

- 使用好的无 RNA 酶技术。
- 使用硫氰酸胍或盐酸胍作为裂解缓冲液[1]。
- 用酸性酚抽提。

[1] 也可以使用 NP-40 裂解液，但使用这种方法纯化的 RNA 来进行 DDPCR，要想得到重复性好的数据就需要更熟练的技能

- 用胍盐缓冲液进行二次沉淀。
- 样品用无 RNase 的 DNase Ⅰ处理。
- 使用由 DEPC 处理的水配制的 70%乙醇充分洗涤 RNA 沉淀，以去除盐分[1]。
- 恰当储存纯化的 RNA。[2]

② 反转录生成 cDNA 以及 PCR

- 每个 cDNA 反应使用相同的 RNA 量（200～300ng）。
- 使用无内源 RNase H 活性的酶将对反应有帮助。
- 避免使用依赖 Mn^{2+} 的反转录酶。
- 永远使用 cDNA 反应总混合液。
- 永远使用 PCR 反应总混合液。

(2) 常遇到的问题

① 有一条或几条泳道出现严重弥散现象

- 优化 Mg^{2+} 浓度（通常降低浓度），每次降低 0.1mmol/L。
- 减少 PCR 循环数到 30 个循环。
- 减少反应中酶的使用量。
- 稍稍增加退火温度。

注意　在某些情况下，1～5 次循环使用 40℃退火，6～40 次循环使用 45℃退火可减少弥散现象。但是这样操作可能减少条带数量多达 25%～30%。

② 无产物产生

- 检查 RNA。
- 加入 RNA 酶抑制剂（如 RNasin）。
- 检验 RT 和 PCR 的组分，特别是酶。
- 核对反应中的每一个组分，并确认所有组分已经充分混合。
- 检查 PCR 循环参数。

③ 低产率

- 样品匀浆或裂解不完全。
- 检查 RNA 沉淀是否完全溶解。
- 测定 A_{260}/A_{280}，如比值小于 1.65 表明有蛋白质或其他物质的污染。
- 检查 RNA 是否降解。
- 从动物中取出的组织样品没有立即处理或冰冻。
- 纯化的 RNA 储存在－20℃，而不是在－80℃。
- 所使用的水溶液与反应管不是无 RNase 的。

④ DNA 污染

- 如果样品没有经 DNase 处理则可能会有 DNA 污染。

⑤ 数据重复性不好

- 使用 200μl 薄壁反应管，如使用厚壁的反应管则需要调整 PCR 循环参数。
- 采用热启动 PCR（见第 19 章）。

---

[1] 含有阳离子的盐可以大量地与 dNTP 结合，从而破坏 cDNA 的合成及 PCR 的进行。

[2] DDPCR 方法对于部分降解的 RNA 的耐受性，比其他以 PCR 为基础的方法更差。

- 对每一个细胞样品配制单个、大体积的总混合物，再等分到各反应管。
- 使一对上游引物和下游引物 T_m 尽量接近。
- 使用能够合成长 PCR 产物的酶（如 *Taq*+*Pwo*）。
- 不要使用矿物油，使用有热盖的热循环仪。
- 抽提 RNA 使用不同的方法会出现这种情况。
- 不是同一天抽提的 RNA 可能出现这种情况。
- 检查细胞或组织的状态。如果细胞和组织处于不同状态（细胞周期的不同时相、组织从不同个体分离、对数晚期相对于对数早期、静止相对于衰老），数据的重复性就会差。
- 如果使用不同的引物对或错用了引物对都将导致这一问题。
- 检查是否使用了不同的反应总混合液。
- 在同一台热循环仪上进行反应的优化和运行（不仅仅是同样型号的仪器）。

（3）综合建议

- 变性步骤时间愈短愈好。
- 变性温度最好低至 90～92℃。
- 延伸温度可以降到 68℃。
- 在每个循环中的延伸时间可适当加长（5～20s/循环）。
- 精确取样对于重复结果是至关重要的，在开始实验时及每隔一段时间应对微量取样器重新校定。准备备用取样器，在取样过程中更换取样器可避免带入污染。
- mRNA 差异显示技术对于 RNA 的实际用量是非常灵敏的。对于大多数 RT-PCR 来讲“少就是多”，在反应中加入过量的起始材料，结果是适得其反的（最佳量是 200～300ng 的 RNA）。
- 与许多 PCR 相关的技术不同，mRNA 差异显示对于起始材料的质量要求特别高。采用含胍的缓冲液提取的 RNA 质量最好。
- 购买含有已选择好的引物的试剂盒，尽量不要订购或自己制备引物。
- 使用硅烷化的微量离心管有利于在各种操作中减少损失。因为 cDNA 和 PCR 产物在再扩增前只有皮克级（甚至更少）的量（具体操作见附录 8）。

22.12 参考文献

Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., and Strauss, M. (1993). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* **21,** 4272.

Callard, D., Lescure, B., and Mazzolini, L. (1994). A method for the elimination of false positives by the mRNA differential display technique. *BioTechniques* **16,** 1096.

Fujita, K., and Silver, J. (1995). Single-strand Conformational Polymorphism. *In* “PCR Primer: A Laboratory Manual” (C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 249–255.

Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., and Pardee, A. B. (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **52,** 6966.

Liang, P., Averboukh, L., and Pardee, A. B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* **21,** 3269.

Liang, P., Bauer, D., Averboukh, L., Warthoe, P., Rohrwild, M., Muller, H., Strauss, M., and Pardee, A. B. (1995). Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol.* **254,** 304.

Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257,** 967.

Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., and Pardee, A. B. (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* **22,** 5763.

Lohman, J., Schickle, H., and Bosch, T. (1995). REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *BioTechniques* **18,** 200.

McClelland, M., and Welsh, J. (1994). RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Applic.* **4,** S66.

Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E., and Chalifour, L. (1994). Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biophys. Res. Commun.* **199,** 564.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5,** 874.

Reeves, S. A., Rubio, M., and Louis, D. N. (1995). General method for PCR amplification and direct sequencing of mRNA differential display products. *BioTechniques* **18,** 18.

Sager, R., Anisowicz, A., Neveu, M., Liang, P., and Sotiropoulou, G. (1993). Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J.* **7,** 964.

Wang, X., and Feuerstein, G. Z. (1995). Direct sequencing of DNA isolated from mRNA by differential display. *BioTechniques* **18,** 448.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20,** 4965.

Zhang, H., Zhang, R., and Liang, P. (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res.* **24,** 2454.

Zhao, S., Ooi, S. L., and Pardee, A. B. (1995). New primer strategy improves precision of differential display PCR. *BioTechniques* **18,** 842.

Zimmermann, J. W., and Schultz, R. M. (1994). Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91,** 5456.

（陆长德译；李伟校）

第 23 章　基因表达的高通量分析

23.1　基本原理

许多研究者一向渴望能有快速筛选大量样品、同时分析尽可能多的基因表达的方法。然而，原来的方法包括 RNA 印迹、核糖核酸酶保护分析以及反转录聚合酶链反应（RT-PCR），固然有其价值，却是低通量的方法。随着以微阵列为基础的筛选法的出现，许多实验室普遍开展大批量表达研究。这些研究提供了大量关于细胞功能以及随着细胞变化而发生的功能改变的信息。最初科学界是带着疑问接受微阵列的。如今，微阵列则普遍作为两个或多个样品平行比较，作为高通量筛选（HTS）的有效手段。随着以微阵列为基础的分析变得错综复杂和自动化，其效能将进一步增强。

23.2　微阵列是什么

微阵列，简而言之为阵列或生物芯片，是在常见的 1in×3in(1in＝0.0254m) 盖玻片或在较大的尼龙滤膜上永久性地印制非常大量的单个基因序列（Fodor 等，1991；Fodor 等，1993）。微阵列原先是为了分析不同生物样品中信使 RNA(mRNA) 的表达而开发的（Schena 等，1995）。它现在也被用来分析基因的拷贝数（Pollack 等，1999）。当前，也开发了以微阵列为基础的其他技术，例如蛋白质微阵列（Fodor 等，1993；见 Haab，2000 综述）（通常称为蛋白质生物芯片）和抗体（Ab）微阵列。

现在，有 3 种微阵列的基本格式或平台，即短的（25 核苷酸）寡核苷酸微阵列、互补 DNA（cDNA）微阵列和较长的寡核苷酸（60～70 核苷酸）微阵列。许多人认为较长的寡核苷酸平台是比较好的，因其灵敏度比 25 核苷酸的更高，还可允许一些错配，而且点与点之间的序列 T_m 值一致。微阵列超过 70 个碱基长度，其灵敏度并不增加，却要增加核苷酸合成的成本。况且，随着寡核苷酸长度的增加，发生差错碱基的概率也增加（见 Barrett 和 Kawasaki，2003 综述）。

DNA 沉积在微阵列表面的作用称为印制。早期只能在实验室内制作微阵列。如今，微阵列可以定制或实验室制造，实验室内制作主要需关注质量控制（QC）问题。寡核苷酸微阵列可在微阵列表面直接合成，或者在他处合成而后沉积在微阵列表面。特别要注意使用费钱又费力的 PCR 产生的 cDNA 印制到微阵列时，同源序列间的交叉杂交是个严重的问题。用在较好的微阵列上的基因序列选自公共数据库，例如，RefSeq、Ensembl、RIKEN 和 HUGO。这些数据库经常在不断更新。印上的序列常是人们熟知的、性质了解得充分的序

列，也包含有功能不明的 DNA 序列。

在单一微阵列上印制的基因序列可数以千计，完成制造微阵列的过程需要专门的自动化设备和其他革新性技术。几种合成微阵列的方法有赖于所用 DNA 的特性。因为购买微阵列的费用高，条件好的实验室常选择自己制备微阵列。人们很容易从销售渠道买到已经包被的载玻片（常是多聚赖氨酸或氨基硅烷包被）。许多销售商也卖 cDNA 和寡核苷酸序列，供应实验室制造微阵列。这样可以节省实验室购买即用型微阵列的额外费用。玻璃微阵列只可用一次，而尼龙的微阵列可以反复使用。在作者的实验室，成功地反复使用^{32}P 和化学发光法测试尼龙的微阵列。然而若将荧光法用于玻璃微阵列，分辨率最佳。简而言之，微阵列表现出收集大量细胞生化的定性和半定量信息的能力。微阵列正迅速成为研究手段的主流。这并未超出人们的预料，因为人类基因组计划的完成获得了相当大量的信息。

过去，每个微阵列印上代表单一组织的序列。然而，现在多组织微阵列已经普及。这就有利于几个组织的同时分析。这个方法类似于普及的、有多家生物技术供应商销售的 RNA 印迹（Northern 印迹）：几个组织的 RNA 印迹准备用于核酸杂交。某种意义上，多组织的微阵列是一种高技术、高通量的原位杂交。它赋予鉴定组织样品架构内细胞类型的基因表达能力。

已有几种微阵列，如癌阵列（有时指一组癌试验系列）。这些专门的微阵列和广范围序列印制的微阵列一样，其设计目的是使研究者可在尽可能大的范围内设计实验。

微阵列是用两个不同来源的样品（处理样品和对照样品）标记的 cDNA 在一个体积非常小的杂交缓冲液中进行探测。最常见的携带荧光染料标记的 cDNA 探针，分别含 cy3-脱氧尿嘧啶-5′-三磷酸（Cy3）和 cy5-脱氧尿嘧啶-5′-三磷酸（Cy5）（Amersham 生物科学公司产品）。用激光扫描时，它们分别是绿色和红色荧光染料标记物。例如，对照组 cDNA 用 Cy3 标记，而处理的或样品组 cDNA 用 Cy5 标记。这些探针混合用于微阵列上作共杂交。如果 Cy3 标记的 cDNA 和 Cy5 标记的 cDNA 杂交到微阵列的同一个点，将同时发出黄色荧光。于是，微阵列上各个点来自 2 种染料的荧光的比，将提供有关特定转录产物丰度的信息。作为变通，玻璃微阵列可用^{33}P 标记的 cDNA 探针，而尼龙微阵列可用^{32}P 或^{33}P 标记的 cDNA 探针。然而，唯有用荧光染料标记才能进行颜色的检测。

23.3　微阵列能做什么

在微阵列上显现基因的表达，最直观明显的优点是，能够在单个杂交实验中分析大量的基因。就是说所有的基因都在微阵列上。也就是说，快速分析成千个基因的结果，使得微阵列的数据正被用作确定特定的与各种疾病发生发展相关的基因。精心设计的微阵列实验能提供有关基因家族的行为问题，或可能阐明有关诸如发病途径的基因种类问题。微阵列提供了一个大批量比较不同种类基因的手段（图 23.1）。

其他更为传统的分子生物学方法也能同时提供分析所有上调和下调序列的机会（表 23.1）。然而，微阵列显著的优点是能处理数量庞大的数据，数据处理和存档具有高速度和高效率以及具有直接鉴定表达有波动基因的功能。和差异显示不同，用于微阵列分析的差异表达的序列不需要克隆与测序。因为微阵列上的序列已经检定，每一点都精确地对应于已知的序列。

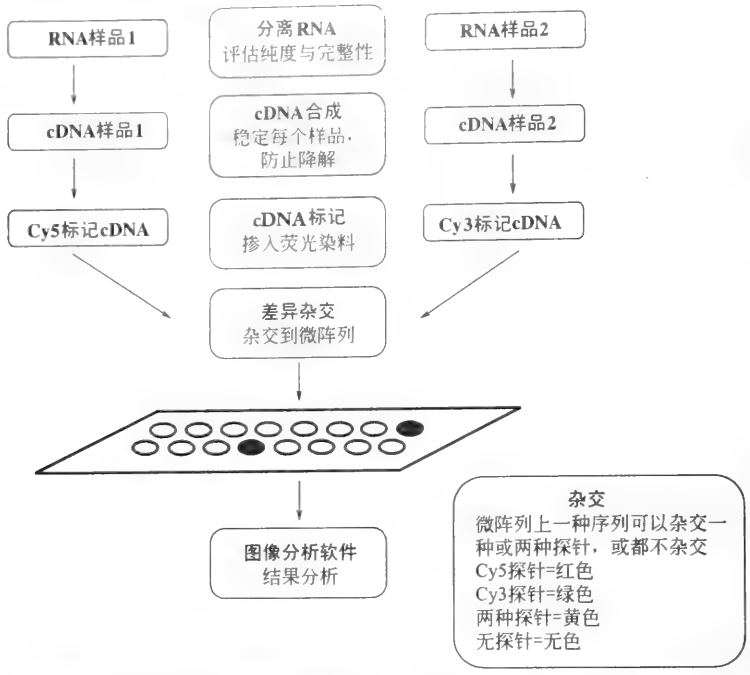


图 23.1　微阵列分析的主要步骤。互补 DNA（cDNA）的合成、标记和微阵列上杂交。结合荧光检测或放射自显影图像分析，提供大量有关所研究样品中基因表达的信息

表 23.1　微阵列、实时聚合酶链反应（PCR）和差减杂交法的比较

项目	微阵列	实时 PCR	差减杂交法
高通量分析	是	不是最佳方法	否
同时筛选许多基因	是	否	是
定量水平	中等	最佳	中等
费用[1]	万	百	个
发现新基因	不能，只能分析芯片上的基因序列	不能，只能分析引物专一的基因	能，是差减杂交法的一个目标
并排比较 2 个细胞群	是	不容易	是
参比物	通常的 RNA	看家基因的 cRNA[2]	驱动组样品
探针标记选项	^{33}P，^{32}P，Cy3，Cy5	6 FAM，TAMRA	^{32}P，生物素
检测选项	放射自显影或荧光检测	荧光检测	放射自显影或化学发光检测
定性	有限的	有限的	有限的
特殊设备与耗材	需要昂贵的芯片或滤膜微阵列，需要分析软件	需要实时 PCR 仪，荧光标记探针或 SYBR 绿，需要分析软件	不需专门的设备

① 任意单位。

② cRNA，即互补 RNA。

如何比较微阵列和 cDNA 文库呢？微阵列为发生任何类型生理或生化变化的细胞或组织提供有关基因的简单印象，它更像扫描一种生物的 cDNA。如前所述，微阵列的序列与可能的生理学意义的关系大多已得到确定。然而注意到这一点是重要的，cDNA 文库极可能含有微阵列上没有的序列。那些序列可能正好代表着未知基因或是已有描述而功能未知的基因。

微阵列技术和分子生物学家使用的大多数其他当代技术是互补和兼容的。这些技术包括实时 PCR、RNA 干扰（RNAi）和转基因研究。微阵列技术并不取代其他久享盛誉的分子生物学方法，而是完善了科学研究的手段。

23.4　微阵列不能做什么

微阵列肯定是方便的高通量分析手段，而不是为了分析一个或者不多的几个基因的手段，阵列技术更是全球通行的方法。重要的是认识该方法和所有其他方法一样，有其固有的局限性。首先，微阵列只能分析实际上已经印制在微阵列上的基因的序列。同样，微阵列并不是发现新基因的工具。微阵列分析与差减杂交的差别，在于后者使得基因呈差异表达，而且不受预先设定的可分析基因的限制。

微阵列最多只能半定量。如果微阵列的数据表明基因表达有差异，则随后在研究所需的条件下，对这些基因的行为通过实时 PCR 作新的全面的定量分析。微阵列局限于它所能提供的定性信息。在微阵列表面只有 cDNA 片段或甚至更短的寡核苷酸，它们被用于杂交标记的探针分子。因此，来自微阵列基因序列的正信号表明有一个特定基因位点的转录，虽然微阵列可能还不能识别可变剪接或多起点转录。全长转录产物的大小只能通过 RNA 印迹分析来阐明。不同起点的转录可通过核酸酶保护或互补 DNA 5′端快速扩增（5′RACE）检测。但是不能保证微阵列分析能用于这种检测。此外，由于微阵列的费用非常高，也许平行分析不可行，可能在许多情况下样品只能分析 1 次。

具讽刺意味的是，偶尔数据分析的含糊不清是源于微阵列突然得出如此多的数据。同样，直接平行地比较也并不总是清楚肯定的。大多数用户认同微阵列的数据并非完美无瑕。另外，微阵列自身不能排除遇到污染物或者实验室技术不良引起的干扰。数据重复性不好的问题也可能源于支原体复合污染。这也是细胞生物学家多年以来需面对的难题，如果从被污染的细胞培养物中分离 RNA，其结果将改变微阵列数据（Miller 等，2003）。

有限量的 RNA 起始材料排除了样品实际使用微阵列分析的可能性。的确，尤其是用激光捕捉、细胞分选或在显微镜下分离组织得到的少数细胞更是如此。在这些情况下，在尝试合成探针之前，常用的一个方法是将 RNA 线性扩增[1]。有一种途径，用含 T7 或 SP6 启动子的下游引物使 RNA 转化成 cDNA。这将使得 cDNA 可以在体外进行转录，从而产生更多的能转化成 cDNA 的 RNA。这种途径可有效地标记而不至于扭曲样品中各种转录产物的天然丰度关系。

23.5　微阵列分析的主要步骤

下面叙述典型微阵列分析（见图 23.2）的基本实施步骤。图 23.2 展示一典型实例。记住，探针标记方法、检测方法、对照 RNA 以及其他参数会因各家实验室的选择而有改变。

① 获得 DNA 分析的微阵列。如前所述，可从很多供应商那里得到可直接使用的微阵

[1] PCR 是导致模板序列指数扩增的过程，因此会扭曲高度复杂的研究样品的真实差别。相反，体外转录时，mRNA 先转化成 cDNA 后，体外再次转录，则能达到 RNA 线性扩增。于是，为保留转录组分的真实丰度的差别，即使需要经过 2 轮或多轮转录来产生适当质量的标记用 RNA，也是值得的。

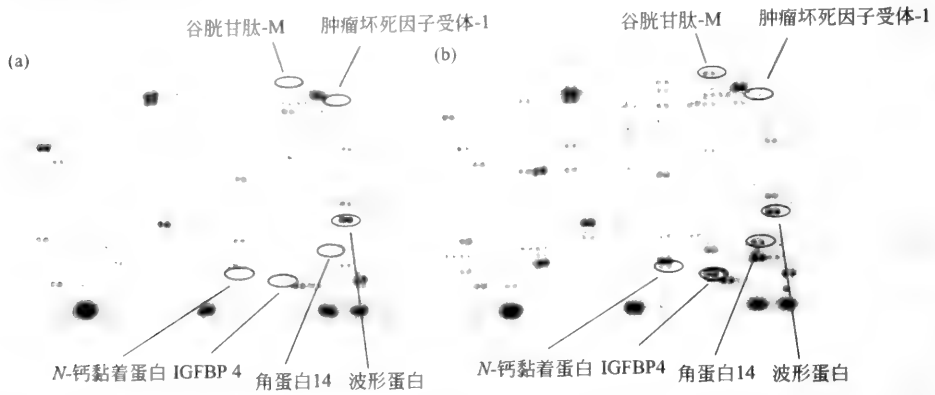


图 23.2 小鼠间皮瘤细胞系差异表达。两片滤膜表示正常细胞（a）和肿瘤细胞（b）。简单讲，互补 DNA(cDNA) 探针是由正常和肿瘤信使 RNA(mRNA) 在^{32}P 存在下合成的。杂交后严格洗涤，经过磷屏曝光成像，数字影像分析。滤膜上的靶基因印迹成对，cDNA 丰度与信号强度直接相关。差异基因表达随后用 RNA 印迹验证。承蒙布朗大学病理与实验医学系 A. Kane 博士提供此图

列，以及可直接用于印制的预处理载片。当然，研究者可能受限于所研究的生物材料，尚无商品化的微阵列，所以，须在实验室自己打印。

② 分离高质量的 RNA。分离高质量 RNA 的方法与评估已在第 5～8 章叙述。一般而言，作为微阵列分析用的 RNA，其 A_{260}/A_{280} 应大于 1.8。

③ cDNA 的合成。通常，由于 RNA 固有的化学不稳定性，如同用于其他类型实验，样品中的 mRNA（即“未知样品”）须转化成 cDNA。然而，已被反复证明，使用携带荧光标记核苷酸（如 dCTP）时，RNA 反转录效率很差，并且倾向于 Cy3 的掺入。间接荧光标记方法的发展解决了这个问题。这个方法采用 dUTP 的衍生物 5-(3-氨丙烯基)-2′-脱氧尿苷-5′-三磷酸。即人们通常所知的氨丙烯基标记法。支持 cDNA 合成的核苷酸混合物含 dATP、dCTP、dGTP 和氨丙烯基-dUTP。比较而言，这种高反应性核苷酸通过反转录酶的掺入，已表明是十分有效的（Hughes 等，2001）。样品反转录以后，荧光染料在随后的反应中与纯化的 cDNA 连接。标记效率和标记掺入程度常通过散射作图法评定，散射图越密集，则用于微阵列分析的探针越是刚标记的。

④ 荧光染料的连接。在氨丙烯基标记反应后，掺入到新合成 cDNA 中的氨丙烯基暴露在反应性的 Cy3 和 Cy5 衍生物 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯前，染料结合到修饰的氨丙烯基核苷酸上。这就是已知的偶联反应，它使染料直接与 cDNA 连接。

⑤ Cy 标记探针的纯化。这个非常重要的步骤旨在从新标记的探针介质中清除未反应的染料。如果此步骤中染料清除得不彻底，微阵列分析的背景将非常高。这就是为什么有时看起来微阵列分析数据的重复性和 cDNA 质量及标记效率并不总是一致的一个原因。首先，高质量的 cDNA 来自高质量的 RNA。其次，清洗探针，即除去未掺入的标记物和反应中的其他化学物质，必须非常小心。

⑥ 微阵列杂交。cDNA 探针直接暴露在阵列上。维持最小体积的杂交缓冲液体积有利于提高探针的有效浓度和有利于杂交动力学。杂交反应的实施是在规定的严格的条件下进行的。

⑦ 从微阵列或滤膜收集数据。使用荧光探针的情况下，可以扫描杂交的微阵列来显现

影像。此后，用微阵列专门的影像分析软件系统“管理”图像。若用放射性同位素探针，常规用胶片捕捉影像。

⑧ 确定数据与生物学意义的关联性。这取决于用户。

23.6　参比 RNA

通用参比 RNA（universal reference RNA，URR）普遍用于微阵列试验。使用通用参比 RNA 是很平常的，特别是在对照组 RNA 不是立刻显而易见的或者不是容易得到时，如在疾病进行期研究中那样。通用参比 RNA 是质量非常高的 RNA。它是合并不同来源的，代表了：①不同组织，有些是难以得到的；②不同丰度的 RNA 种类。这些或其他市售的参比 RNA 必须通过严格的质量控制（QC）实验。通常要保证 A_{260}/A_{280} 大于 1.8，要证明是不含基因组 DNA 的制剂，要经电泳证明 28S rRNA：18S rRNA 的荧光比值至少达到 2：1。严谨度水平上的质量控制对于最适化分析是绝对需要的。而且可能对分析的标准化是更重要的。通用参比 RNA 的功能性描述是大家知道的基因的覆盖度，即与其杂交的微阵列序列数。基因覆盖度对于在基因间进行比较研究的目的是重要的。典型的覆盖范围在 86%～99%。

进行微阵列实验有如下 2 种方式。

① 成对的设计。样品 1 和样品 2 标记后与同一微阵列杂交。例如用 Cy3（绿色）标记样品 1，用 Cy5（红色）标记样品 2，然后两者与同一微阵列杂交。如果有 4 个样品，研究者必须进行总计 6 次的杂交，包括所有的组合。

样品 1＋样品 2	样品 2＋样品 3
样品 1＋样品 3	样品 2＋样品 4
样品 1＋样品 4	样品 3＋样品 4

进行样品 1/样品 2 的比值分析。当然，对所有 6 个微阵列做同样的分析处理。

② 通用参比 RNA 的设计。这种途径减少了所需杂交的数量，因为每一个标记样品（用 Cy3 标记）（在这里是样品 1～样品 4）分别与通用参比 RNA（用 Cy5 标记）一起与微阵列杂交。这种方式只需要 4 次杂交。比值分析为样品 1/ URR，样品 2/ URR，样品 3/ URR，样品 4/ URR。通用参比 RNA 设计的优点主要是单个样品可以直接比较。因为每个样品都有对应的单个共同对照，但是用户常常必须与实验室里其他实验作交叉对比[1]。在能得到通用参比 RNA 之前，各实验室有其专用的方案，研究者常常不能直接比较微阵列的分析数据。由于通用参比 RNA 是按工业规模制造的，量非常大的小包装同属一批，可供长期研究之需，而且同时适于地理上相距甚远的合作实验室使用。

23.7　应　　用

微阵列技术商品化的发展来自生物化学和半导体工业的联姻。因为该工业对科学界所固有的价值，卖主的数量从一个（Affymetrix）增加到包括 Agilent、Amersham 在内的若干

[1] 在比较密切相关的若干套数据时，这里极力推荐使用同一批微阵列。

个，以至难以计数。简而言之，任何研究基因表达的人都可以利用微阵列技术的优点，因为它提供基因表达的全貌，至少是印迹在滤膜或芯片上的序列的缩影。不幸的是，芯片的复制是非常昂贵的，并且数据点的缺失常常使得统计成了问题。与微阵列相关的检测也有其上限和下限。目前实时 PCR 是唯一的方法，它可以非常准确地量化微阵列数据给出的大范围动态过程中的基因表达变化。实时 PCR 也是目前唯一能验证微阵列数据的方法。实时 PCR 能准确地揭示由微阵列找到的变化基因的调节幅度，即基因在多大程度上受到调节。因此，这两种方法互补性很强。

显然，对疾病过程、发育现象、功能性基因组学的所有领域及细胞对药物应答进行基础研究或发展研究的实验室，都会对微阵列技术有极大的兴趣。一二种微阵列可能很快将投入临床使用。

重要的是要记住，RNA 往往不能提供（翻译、表达的）全貌。基因表达还包括翻译，以及经翻译后修饰，功能蛋白质的生产。同样，蛋白质芯片的开发被用来发现细胞生产什么蛋白质，以及这些蛋白质在做什么。抗体（Ab）微阵列构成类似的方法，它用于数以百计的蛋白质的同时表达分析。这就是人们所知道的表达谱。与 DNA 微阵列类似，抗体微阵列产生的数据与样品中特殊蛋白质的相对水平有关，而不仅仅只是回答其有或无。这些抗体微阵列由双份印迹在微阵列上的各种单克隆抗体组成。选用的抗体应能代表一个特定的项目，例如肿瘤。并且这些抗体通常应能用来表示许多在整个细胞内不同定位的蛋白质。目前报道的方法灵敏度常常达到 10pg/ml 水平。

23.8 参考文献

Barrett, J. C., and Kawasaki, E. S. (2003). Microarrays: The use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discovery Today* **8,** 134.

Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P., and Adams, C. L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* **364,** 555.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251,** 767.

Haab, B. B. (2001). Advances in protein microarray technology for protein expression and interaction profiling. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **4,** 116.

Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Schelter, J. M., Meyer, M. R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y. D., Stephaniants, S. B., Cavet, G., Walker, W. L., West, A., Coffey, E., Shoemaker, D. D., Stoughton, R., Blanchard, A. P., Friend, S. H., and Linsley, P. S. (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotech.* **19,** 342.

Miller, C. J. Kassem, H. S., Pepper, S. D., Hey, Y., Ward, T. H., and Margison, G. P. (2003). Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *BioTechniques* **35,** 812.

Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., and Williams, C. F. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **23,** 41.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270,** 467.

（邹永水译；陆长德校）

第 24 章　RNA 干扰——目标基因的沉默

24.1　基本原理

在 20 世纪 80 年代中期，一系列关于体外 DNA 合成新方法的文章相继发表（Saiki 等，1985；Mullis 等，1986；Mullis 和 Faloona，1987）。虽然这种现在被称为聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）方法的本质并非新创，即一贯广为用作作图和探针标记的引物延伸反应，但 PCR 的新型引物延伸技术给羽翼渐成的生物工程学带来了产业革新。PCR 技术改变了一切，对生命科学研究以及其他更为广阔的领域的各个方面起到了正面推动作用。法医学、基础研究和应用研究、传染病的诊断以及亲子鉴定能达到今天精确、灵敏、完善的水平，都应归功于 PCR 技术。现在，另一项非凡的技术诞生了。它就是利用双链 RNA（dsRNA）抑制特定内源基因表达的 RNA 干扰[1]（RNA interference，RNAi）技术。RNAi 技术最初在线虫（*Caenorhabditis elegans*）（Fire 等，1998）系统中获得成功，随后又发展到人和其他哺乳动物细胞系统（Hammond 等，2000；Elbashir 等，2001a）。自诞生以来，RNAi 在方法学上的改进已显示出它给研究带来了和 PCR 一样深远的影响。RNAi 技术又常被称作基因敲除（gene knockdown），其他相关的名词还有转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing）（植物）、共阻遏（cosuppression）（旧有名词，植物）和压抑（quelling）（真菌）。

首次在矮牵牛中发现 RNAi 时，这个自然现象曾一度被引为怪谈（Napoli 等，1990；van der Krol 等，1990）。现在已知在许多物种中都存在 RNAi 机制，是生物体用以抵抗病毒和转座子以及可能损坏宿主基因组引起灾害的外来入侵分子的一种手段。值得注意的是，“dsRNA 一旦进入细胞就立即被破坏”，这种用来保护真核细胞基因组完整性的方法在进化上是高度保守的。RNAi 在自然条件下参与的过程，包括野生型 mRNA 及突变型 mRNA 的降解作用，生物体发育过程中的翻译调控，当然还包括其他在细胞中未被揭示的调控机制。目前有证据暗示 RNAi 可能与 DNA 甲基化有关（Wessenegger 等，1994；Llave 等，2000；Merrett 等，2000；Pélissier 和 Wessenegger，2000）。

利用 RNAi 对细胞或生物体内基因表达的影响进行研究，通常被称作反向遗传学（reverse genetics）。它的目标是确认某一蛋白质在细胞内不表达时所造成的后果。这对发育生物学、传染病的治疗以及其他由于蛋白质不当表达所引起的疾病治疗中都有意义深远的作

---

[1] RNA 干扰是经专利注册的操作。该操作的商业应用需获得华盛顿卡耐基研究所的许可。联系方式为：管理与财务主管，Carnegie Institution of Washington，1530 P Street，N. W.，Washington，DC 20005，电话为 202-939-1118。

用。RNAi 的主要优势在于可以长时间地一次就一个基因进行研究。

RNAi 现在已成为基础研究和应用研究的主流技术，并给功能基因组学研究带来了革命。作为真核细胞所特有的现象，RNAi 现在已成为研究动物、植物和真菌的基因表达调控的优先手段。由于 RNAi 技术在培养细胞和体内模型中均有效，其研究应用范围极广，因此越来越受到欢迎。与培育基因敲除动物相比，RNAi 技术是研究目标基因功能更为快捷经济的方法。并且，RNAi 在沉默目标基因方面表现出的精确性，也使之成为研究开发救生药物的极好的研究平台。芯片技术能帮助把上调或下调的基因和某种机能失调联系起来，RNAi 则阐述了其中的因果关系。RNAi 技术是如此的意义重大，以至于 2002 年被享有声誉的期刊 *Science*[1] 评为“年度科技突破”。不出所料的是，后来针对此项技术的市场需求突增，多家专门提供相应支持服务和预制高效短干扰 RNA（short interfering RNA，siRNA）寡核苷酸之类试剂的公司成立了。

24.2 重要的 RNAi 术语

antisense RNA：反义 RNA。与 mRNA 序列互补和可与之碱基配对的单链 RNA 分子。总的来说，反义 RNA 的稳定性比 dsRNA 差。

argonaute：一个高度保守的蛋白质家族。它通过和 Dicer 以及“RNA 诱导沉默复合物”（RNA-induced silencing complex，RISC）相互结合参与 RNAi 过程。有报道指出，不同 argonaute 蛋白质组合可能通过不同的途径对 RNAi 起促进作用。并且 argonaute 在细胞中也可能有其他作用（Carmell 等，2002）。

Dicer：三型双链特异核酸酶。负责将内源或外源长链 dsRNA 切割成 21～23bp 的片段（siRNA）。这些 siRNA 片段随后和 RISC 结合，如果设计合理，并和目标 mRNA（待沉默 mRNA）的互补序列杂交。天然和重组 Dicer 都有商业制品。Dicer 可以把长双链 RNA（dsRNA）和短发夹 RNA（shRNA）加工成 siRNA。它也可以把某些 shRNA 加工成 miRNA。

dsRNA（double-stranded RNA）：双链 RNA。包含有碱基配对的正义 RNA 和反义 RNA 的核酸，会被 Dicer 切割成 siRNA。

ddRNAi（DNA-directed RNA interference）：DNA 指导的 RNA 干扰。利用 RNA 聚合酶Ⅲ启动子在哺乳动物细胞中产生 siRNA 的方法。这种方法产生的 siRNA 在结构和功能上与体外合成的 siRNA 一致。

dsRNAi（double stranded RNA interference）：双链 RNA 干扰。利用 dsRNA 通过 RNAi 途径进行的基因沉默。

miRNA（microRNA）：微 RNA。单链约 21nt 长的 RNA，通过错配而非降解 mRNA（虽然后者也有可能）的方式阻碍特定的 mRNA 翻译（translational repression，翻译阻遏）。miRNA 在发育和细胞分化进程中对基因表达进行重要的短暂调控。miRNA 是由 Dicer 对长度为 70～90nt 的（发夹）前体加工而来。

PTGS（post transcriptional gene silencing）：转录后基因沉默。用来描述基因表达抑制的一个术语，尤其用于描述植物中细胞已表达某一转录本后由于多种因素导致的该基因表达

[1] [illegible]

抑制。目前文献中出现的 PTGS 对许多研究者而言已经成为 RNAi 的同义词。

RISC (RNA-induced silencing complex)：RNA 诱导沉默复合物。一个含有某些 argonaute 蛋白质的多种蛋白质所构成的复合物，负责与 Dicer 催化产生的 siRNA 片段结合。siRNA 双链中的一个链随后被用来和靶 RNA（mRNA、病毒 RNA 等）进行碱基配对，以此作为降解的标志。

RNAi (RNA interference)：RNA 干扰。一种自然产生的由 siRNA 介导的基因沉默机制。技术上而言，RNAi 就是由 dsRNA 所诱导的 PTGS。

shRNA (short hairpin RNA)：短发夹 RNA。拥有正义结构域（domains）和反义结构域，便于形成分子内碱基配对的单链 RNA 分子。配对后所形成的双链分子类似于典型 tRNA的一个臂，有一个 8 碱基的单链环与正义序列和反义序列所构成的茎相连。shRNA 是 Dicer 的底物，会被 Dicer 切去环区。

siRNA (short interfering RNA)：短干扰 RNA。短片段的长度为 21～23bp 的双链 RNA 分子，3′端有 2 个核苷酸（单链）突出。

U6：人源的 RNA 聚合酶Ⅲ启动子。该启动子常被装配在转录载体内用于已知 shRNA 的体内合成。

24.3　RNAi 是如何工作的

RNAi 是一种由 dsRNA 诱发的内源性催化途径。在细胞被 dsRNA 病毒感染，或是人为导入了诱导同源转录本降解的 dsRNA 时，这种途径可在细胞内自发产生。RNAi 所产生的净结果，就是由破坏 mRNA 所导致的特定基因的降解。

在近 5′末端或是 mRNA 的全长序列内形成双链结构可以抑制翻译的发生。这一观点并非新知。早在 20 世纪 70 年代晚期，小片段反义 DNA 就被用来抑制基因的表达（Zamecnik 和 Stephensen，1978）。在体外的哺乳动物系统中，反义 RNA 也显示了调控基因表达的能力（Nishikura 和 Murray，1987）；在噬菌体、细菌和植物中（Green 等，1986）以及动物中（Knecht 和 Loomis，1987）也有同样的调控作用发生。以前曾一度有过将反义 RNA 用作治疗药物的构想，但是由于反义 RNA 在低浓度时无法发挥作用，而高浓度的反义 RNA 又可能具有细胞毒性而中断。在体外使用反义 RNA 抑制基因表达若干年以后，正义 RNA 被证明具有同样良好的特异基因表达抑制作用（Guo 和 Kemphues，1995）。但是，随后有证据表明（Fire 等，1998），双链 RNA 的效率要高于单独使用正义 RNA 或是反义 RNA。由正义 RNA 所引起的基因沉默是因为与其中污染的反义 RNA 形成了少量的双链 RNA。现在人们知道双链 RNA 具有极强的下调互补基因的能力。

诱导 dsRNA 的途径有好几种，每种又有几种排列。RNAi 基本是两步反应历程（图 24.1）。RNAi 第一步所涉及的主导催化酶，是被称作 Dicer 的三型双链特异核酸酶。这个广泛存在于真核蛋白质组内的核酸酶，参与将长链 dsRNA 消化成长度为 21～23bp、两条链的 3′侧各有两个核酸突出为特征的 siRNA（Zamore 等，2000）。此外，siRNA 带 5′-磷酸与 3′-OH 末端。Dicer 由氨基端螺旋结构域、两个一前一后的 RNase Ⅲ结构域和 PAZ 结构域（来自 PIWI 蛋白、argonaute 蛋白和 zwille 蛋白的名字）组成。它特异识别 3′悬垂和双链 RNA 结合结构域（dsRNA-binding domain）的羧基末端。长双链 RNA 可以被导入细胞，成为 Dicer 的底物。另外，重组 Dicer 可用于体外产生 siRNA，然后这些小分子用转染的方

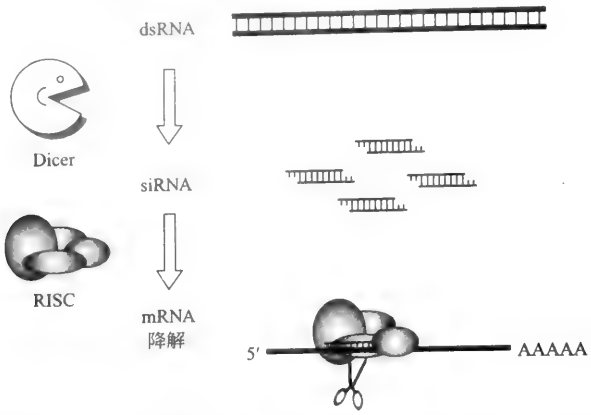


图 24.1 RNAi 过程中的主要步骤。各种来源和各种结构的双链 RNA 被 Dicer 剪切成 siRNA。后者转而成为多组分的 RNA 诱导沉默复合物（RISC）的一部分。最终导致靶 mRNA 的破坏并伴随着造成基因表达下调

法导入细胞。第二步，不管何种来源的 siRNA 成为多组分含核酸酶的 RISC 的一部分。RISC 的精确组成和作用还不清楚。虽然已知 RISC 组成中含有 argonaute 蛋白、仅在 argonaute 蛋白和 Dicer 中发现的高度保守的 PAZ 结构域、仅存于 argonaute 蛋白中的 PIWI 结构域，但它的功能尚不清楚。RISC 的一个部分是 ATP 依赖的解旋酶，它使双链的 siRNA 解旋。任何 siRNA 中的反义组分可以碱基配对于 mRNA，并使之沉默。siRNA 的反义组分与对应的 mRNA 形成双链，并使 mRNA 毁灭。RISC 在短暂形成的双链区中央剪切 mRNA（Elbashir 等，2001b）。然后，mRNA 进一步降解，阻止 mRNA 与细胞翻译机器间的任何相互作用。

RNAi 引发基因沉默有三种主要方法：①siRNA；②shRNA；③ddRNAi。每种方法都有其优点和缺点（表 24.1）。很难讲哪种方法优于其他方法，因为 RNAi 太新了。最好的做法是，在同一实验中使用多种方法，然后决定哪一种方法对该实验最合适。每种途径都可以有多种改变，虽然它们全都是最终剪切靶向的特异 mRNA。

表 24.1 RNAi 中，siRNA 与 shRNA 的比较

siRNA	shRNA
昂贵	经济
比 shRNA 容易设计	比 siRNA 较难设计
体外转录或体内生产	主要通过表达，但也可化学合成或体外转录
毒性是一问题，特别在哺乳细胞或神经元中	毒性通常不是问题
抑制效率可维持 5～7 天	可以用来获得稳定细胞株
开始到结束的时间较短	需要高纯度
聚焦于短期作用	持续基因表达抑制
	开始到结束要更多的时间
	聚焦于长期作用

24.3.1 siRNA 的导入途径

可以用合适的转录载体（Brummelkamp 等，2002）导入细胞制造 siRNA，或者用纯化的 siRNA 转染细胞导入 siRNA。在前一种场合，长的 dsRNA 用阳离子脂质体或蒎脑二醇

包裹后导入细胞（Gruber 等，2004），或者用先前转染基因的（+）链和（−）链在体内转录。在细胞中，当长的完全配对的 dsRNA 为 Dicer 作用，产生特征性的 21～23bp 的 siRNA；这种长度的 siRNA 无处不在。这提示除了如前面叙述的之外，任何 26nt 或更长的 dsRNA 最可能诱导成 RNAi（Parrish 等，2000）。

dsRNA 的长度在涉及哺乳动物细胞的实验中极其重要，大于 30bp 的 dsRNA 很可能诱导一种干扰素应答，结果导致细胞凋亡。在较低等的真核细胞和植物中证明了 RNAi 的功效之后，随后证明了借着将体外产生的 siRNA 转染到哺乳动物细胞中，而不是把长链 dsRNA 导入细胞，可以绕过干扰素应答（Elbashir 等，2001a；Elbashir 等，2001b）。已经证明导入体外合成的短至 19bp 的 siRNA 可以诱导 RNAi。

另一个策略是体外合成 500～750bp 的 dsRNA，然后用 Dicer 预先消化，从而创建一个 21～23bp 的 siRNA 库（图 24.2）。然后 siRNA 库可以转染细胞诱导 RNAi。为了提供广泛覆盖整个 mRNA 而需要一个复杂的 siRNA 库时，特别是当需要沉默一个基因的精确的 siRNA 序列还不清楚时，这个体外方法特别有用。

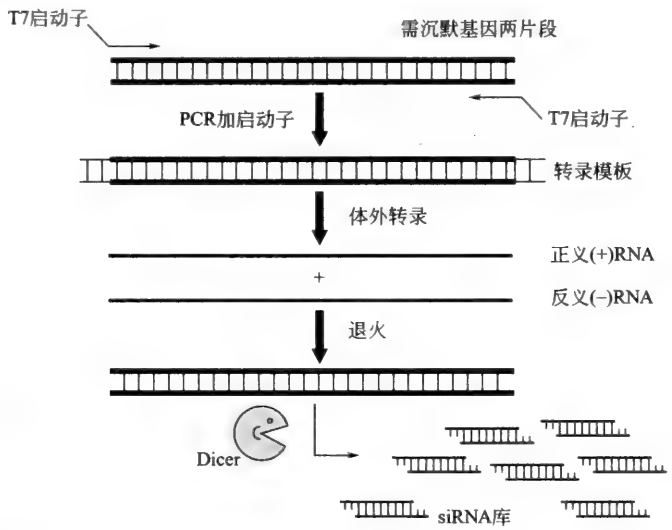


图 24.2　异源 siRNA 库的体外合成。通过 PCR 加上 T7 转录启动子（见第 19 章）。因为转录物模板的两端均有 T7 转录启动子，故 PCR 产物可用于体外转录获得正义 RNA 和反义 RNA。几小时退火，Dicer 处理得 siRNA 库。然后 siRNA 按常规可以与 RISC 作用

24.3.2　shRNA 的导入方法

shRNA（Paddison 等，2002；Yu 等，2002）是一种用来抑制基因表达的 dsRNA 分子或 siRNA 的替代物。shRNA 是单链 RNA，它借着反向重复序列的特点，在分子内碱基配对。shRNA 一般在体外（图 24.3）或者通过使用转录载体在体内（见后面的 ddRNAi）生成。一旦形成，shRNA 分子就被 Dicer 加工，随后能够引起基因沉默，与使用 siRNA 的情况非常相似。shRNA 分子是特征性的，它的组成是：在沉默 mRNA 时完全相同的 21～29 个碱基组成的正义（+）部分，一个 8 碱基的单链环，一个与正义序列精确互补的反义序列。siRNA 也是特征性的，它在 3′端有一个 UU 二核苷酸末端悬垂（图 24.4）。像 siRNA 一样，shRNA 可通过脂质体而导入哺乳动物细胞中。

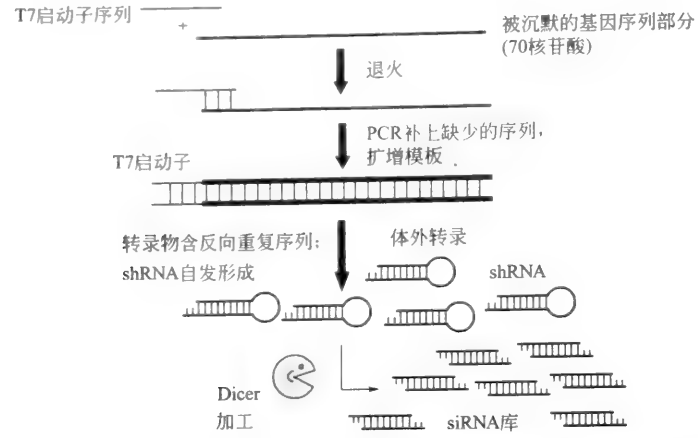


图 24.3　体外产生 shRNA 的方法。用 PCR 构建转录模板。与图 24.2 不同，只在一端加 T7 启动子。被构建的模板含反向重复序列，它们由正义域和反义域组成。转录物形成的结构能快速形成 shRNA 分子。该分子随后被 Dicer 剪切成可诱导 RNAi 的 siRNA 库

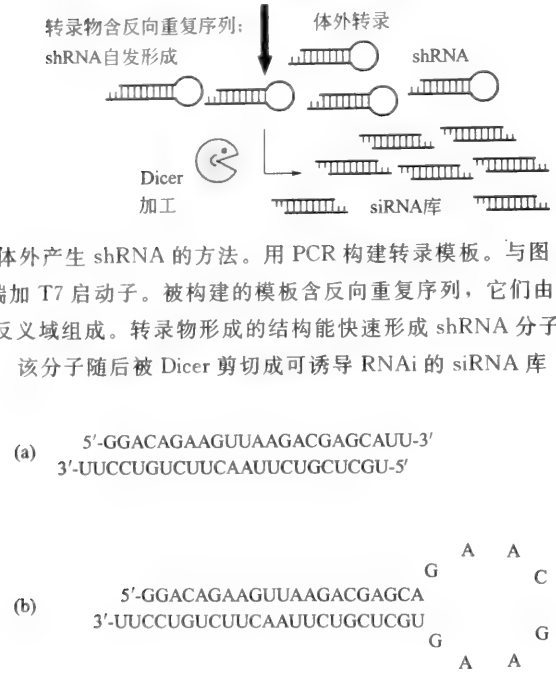


图 24.4　比较 siRNA 和 shRNA 的结构。(a) siRNA 分子由两个互补的 RNA 分子组成，其特征为二核苷酸悬垂于每条链的 3′端。(b) shRNA 由一条单链分子组成。分子内的正义域和反义域使其快速形成发夹样结构。折叠的分子有一个 8 碱基的单链环和类似于 siRNA 分子的 3′UU 悬垂。环与正义域和反义域相连接，并被随后的 Dicer 解除，shRNA 成为了 siRNA。注意两种分子可以沉默同一个 mRNA，因为它们相应的双链区有完全相同的碱基序列

24.3.3　DNA 指导的 RNAi 技术

诱导 RNA 介导的基因沉默，还有另一种方法叫作 ddRNAi。与外源 dsRNA 转染对比，这种方法是用来生成 siRNA 的体内技术。

重要的是要注意到，细胞内生成的 dsRNA 不诱导哺乳动物细胞内干扰素的应答。而长链 dsRNA 从外部进入细胞时会诱导干扰素应答。在 ddRNAi 情况中，细胞内的 Dicer 负责 siRNA 分子的合成，最终导致基因沉默。含 ddRNAi 的转录载体可以用任何标准的转染技术导入细胞。这种方法的优点是节省费用，长期干扰，并且能够通过可诱导的启动子随意开关 RNAi 的历程。许多大众化的转录载体（如 Benitec；Brisbane，Australia）都含有反向重复序列，以使新转录的 RNA 形成发夹结构，它可作为 Dicer 的底物被加工成 siRNA（图 24.5）。

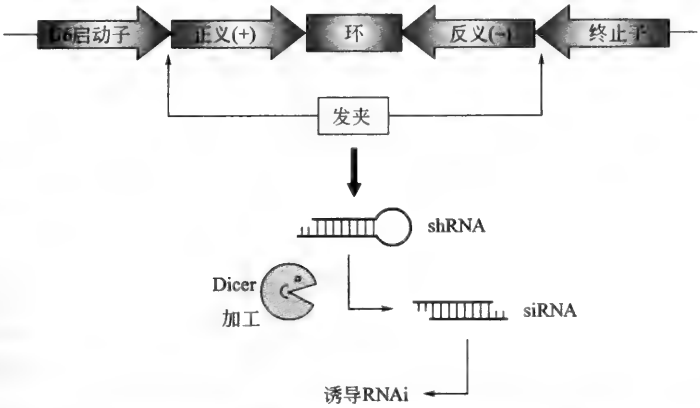


图 24.5　产生 shRNA 的体内转录模板。构建的模板在 U6 启动子操纵下（RNA 聚合酶Ⅲ）。
注意：正义域和反义域的方向是相互面对的，被一编码单链环的短区段分开。
产物 shRNA 转录物是 Dicer 的底物，Dicer 转变 shRNA 成 siRNA 并诱导 RNAi 途径

24.3.4　siRNA 导入哺乳动物细胞的技术

很清楚有许多方法可以用 RNAi 来抑制基因表达。往往选择哪一种方法是根据传输方法决定的。例如，如果一种特定的细胞不能有效地转染，那么在体内生成 shRNA 就成问题。

任何长度的 dsRNA 都能在体外生成，并且用转染技术传输到细胞中。同样 siRNA 和 shRNA 也能用这种方法传输。而哺乳动物细胞的问题是任何长度大于 30bp 的 dsRNA 都会引发细胞的干扰素介导应答（Martinand 等，1998），但是这对其他类型细胞来说不是问题。为了排除这个困难，shRNA 可以在体内生成，因为在细胞内生成的 dsRNA 不会引起干扰素应答。大多数体内转录策略涉及设计一个反向重复序列，结果使得单链转录物一旦形成就会迅速在细胞内折叠和启动 RNAi 途径。基因沉默的有效性最终必须用 Western 分析、其他免疫学技术和/或 RT-PCR 证实。

24.4　有效的 siRNA 设计

毫无疑问，功能性基因组学已经极度依赖于 RNAi 技术。RNAi 已经成为用来检查体内和体外基因功能的主要方法，而 RNAi 的成功取决于 dsRNA 的正确设计。现在人类基因组序列已经完成，在 RNA 寡核苷酸设计过程中生物信息学是不可缺少的。在人类细胞中一个错配就会影响 RNAi，而一个以上的错配就会抑制 RNAi。那些卖 RNAi 相关产品的公司，一般都会提供免费的可进入网络的设计工具（表 24.2）。

表 24.2　供选择的 siRNA 设计工具

Promega	www. promega. com/siRNADesigner
Qiagen	www. qiagen. com/siRNA
Dharmacon	www. dharmacon. com/siDesign
Ambion	http://ambion. com/techlib/misc/siRNA_tools. html
Oligo Engine	www. oligoengine. com
Whitehead Institute	http://jura. wi. mit. edu/siRNAext

注：siRNA -短干扰 RNA。

设计的最基本要求是，dsRNA 必须钝化目标 mRNA。设计的 dsRNA 序列必须精确指令发生 mRNA 断裂的位点。非常重要的是，dsRNA 不可以扰乱任何其他基因的表达，因为只有高度专一并且没有副反应，才能不影响专一基因外的功能和细胞生理。普遍认为所有的基因都能被 RNAi 沉默，虽然非常清楚并不是所有的 siRNA 都能够使 mRNA 裂解。

有效的 siRNA 是 21～23nt 的带有对称的 UU3′悬垂的双链。在设计 siRNA 时有一些基本的规则应当遵守，而且大多数涉及 RNAi 技术的公司都有专利性的算法，可以使沉默基因的有效性最大化。某些基本的 siRNA 设计原理是直观的，并且有设计 PCR 用寡核苷酸的标准指南提示。有一篇 siRNA 设计基础的综述（非正式名称为 Tuschl's 规则）（见 www. rockefeller. edu/labheads/tuschl/siRNA. html）。这些规则包括：限制（G＋C）含量为 50%或更少，鉴定列出的靶至少要有 3 个或 4 个碱基不同于基因组中任何其他相似大小序列（一般是 21 个碱基的序列），以及因为 siRNA 的不可预知性，每个靶要设计几个不同的siRNA。就像 PCR 引物一样，应当避开可能形成不希望得到的二级结构的区域。siRNA 应当有对称的 UU3′悬垂，mRNA 中的靶位置应当是 AA 开始的。在计划设计体外或体内 ddRNAi 时，重要的是要避免含有连续的 4 个或 4 个以上相同碱基，因为这样会引起从常用的人类 U6 启动子（Paul 等，2002）起始的转录过早终止。在相关 ddRNAi 方法中，用 4～5 个胸苷使转录终止。

因为抑制比率随转录物不同而变化，因此，针对 mRNA 的不同区域实验 3 个或者更多个 shRNA，查找到至少一个高度抑制靶基因表达（＞90%）的序列，以确保基因沉默。这既不是不正常的也不是没有理由的做法。另一种策略是合成大量的 dsRNA 确保广泛覆盖 mRNA。这可以用长双链 RNA 开始做，例如，一个转录物的完全编码区，然后用 Dicer 加工成能够黏合在几乎全长的转录物上的 siRNA。

24.5 体外和体内的问题

尽管在植物、动物和真菌界广泛存在 RNAi 机制，具讽刺意味的是，至今人们对这个利用 dsRNA 进行强大调控的机制依然所知甚少。虽然在一个真核生物与另一个真核生物的 RNAi 过程之间确实存在一些相同之处，但是目前的证据越来越清晰地显示出其中存在微妙的差别。RNAi 还处于初级阶段，而且，这种技术的每一个新发展，都需要小心评估计划用来作为模型的系统。表 24.3 中列出了与这种技术使用相关的优点和缺点。当前，RNAi 作为一种工具还很不完善，但是用它来研究基因功能肯定是吸引人的。

表 24.3 RNAi 的优点和缺点

优　点	缺　点
每次检测一个基因的功能	RNA 寡聚物比 DNA 寡聚物贵
对目的基因有高度专一性	需要较多的技术训练
是研究基因功能及研究什么基因参与什么途径的系统手段	大于 30bp 的 dsRNA 在哺乳动物细胞中上调干扰素响应基因，导致凋亡
进化上高度保守的过程，降解 mRNA 比核酶更有效	某些细胞，特别是神经元，倾向于抗 RNAi
比磷硫代的寡核苷酸毒性低	有时重复性是个问题

续表

优　点	缺　点
容易导入哺乳动物细胞	无论怎么合理设计，某些 siRNA 就是无效，要求用实验-误差途径
非常符合药靶鉴定	缺失合适的阳性对照和阴性对照
更有利的是，dsRNA 在低浓度时，比反义寡聚物有效	因为实验方案的多变，实验室间的比较有困难
	合成的 RNAi 寡聚物必须非常纯（脱盐、脱保护、HPLC 纯化、质谱等）

注：dsRNA—双链 RNA；HPLC—高压液相色谱；mRNA—信使 RNA；RNAi—RNA 干扰；siRNA—短干扰 RNA。

诱导 RNAi 的细胞类型决定了 dsRNA 可用的长度。在哺乳动物细胞中，大于 30bp 的 dsRNA 诱导干扰素应答，导致凋亡。而小于 30bp 的 dsRNA 则显著诱导 RNAi。因此，一个基本差异是：siRNA 是在体外制备的，然后转染到哺乳动物细胞中，而长 dsRNA 可以直接导入非哺乳动物细胞中，细胞内的 Dicer 将负责 siRNA 的生成。

其他影响总的 RNAi 效率的因素包括：靶 mRNA 和编码蛋白质两者的丰度和稳定性，剪切靶 mRNA 的精确区域，以及 dsRNA 导入细胞的转染效率。人们也知道 siRNA 和 mRNA间的碱基对必须 100%互补，因为在哺乳动物细胞中这些分子之间的错配会明显降低 RNAi 的作用，推测也降低了干扰素应答。用 poly I∶C（一种用来诱导干扰素强制应答❶而合成的双链多聚 RNA）数年前就已经清楚地证明了这一点。

最理性设计的 siRNA 也可能是无效的，这可能是由于可变剪接。可变剪接如果不是全部，也至少是大部分高等真核生物 mRNA 的特征。例如，如果一个 siRNA 被导向一个 mRNA 成熟期间将被剪接除去的外显子（图 24.6），则那个特定的 siRNA 将不能引起基因沉默。

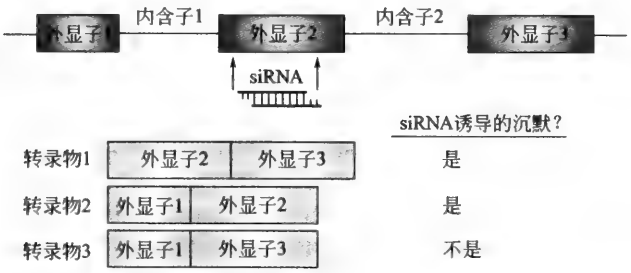


图 24.6　不同的剪接可以影响 RNAi 的成功。对于很多基因 mRNA 生物合成来说，hnRNA 的可变剪接是正常的过程。如果 siRNA 靶向的外显子被从 mRNA 前体中剪接除去，因为 siRNA 无能力与模板结合，因此 RNAi 将不能被诱导。为什么很多设计很好的 siRNA 无法抑制某些基因的表达，可变剪接可能是主要原因

为了改善 RNAi 的效率，合成 dsRNA 时使用 2′-F-CTP 和 2′-F-UTP（氟位于通常为氧占有的 2′位上），结果大大稳定了 RNA，使得 RNA 能抗通常在人细胞中和人手上发现的很多核酸酶（Capodici 等，2002）。

❶ Ampligen（Hemispherx Biopharma；Philadelphia，PA）是基于双链 RNA 诱导干扰响应能力的实验药物。但是，它不同于 poly I∶C，Ampligen 是含有错配的同聚双链类似物［poly(I)-poly(C-U)］(Strayer 等，1982)。Ampligen 目前在临床试验阶段。细节可访问 www. hemispherx. net。

比起细菌转化来，真核细胞的转染是更大的挑战。一些哺乳动物细胞似乎反抗转染。人们尽最大的努力，得到的转染效率还是很低。经典的磷酸钙转染伴随着某些毒性。几年前因为发展了脂质体输送载体，这个困难得到了缓解，但还是有很多困难，包括 siRNA 的导入、持续性等。特别是培养的神经元和原代细胞，因为不清楚的原因，对转染有天然的回复能力。有趣的是，某些情况下，与双链质粒 DNA 相比，似乎 siRNA 可以更有效地被某些细胞吸收（Krichevsky 和 Kosik，2002）。对于那些无法使用这类方法（转入双链质粒 DNA）分析的细胞类型而言，上述现象（siRNA 可以更有效地被某些细胞吸收）的发现，为人们打开了整体性深入分析细胞中基因表达的大门。同时，如何提高包括质粒、dsRNA、siRNA以及很多其他可能有用的化合物导入时的转染效率，研究人员现在也正在探索转染的新方法（Weil 等，2002）。

RNAi 研究方面另一个主要问题是 RNAi 抑制作用的时间进程。例如，在培养细胞中恒定表达 siRNA 的载体可用于治疗特殊的遗传疾病，不管这种疾病的起源（天生的，诱导的）。在体外，这一系统可用来分析长期的基因沉默，以及分析细胞和组织水平的任何副作用。

24.6 参考文献

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296,** 550.

Capodici, J., Kariko, K., and Weissman, D. (2002). Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J. Immunol.* **169,** 5196.

Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., and Hannon, G. J. (2002). The argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* **16,** 2733.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411,** 494.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15,** 188.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391,** 806.

Green, P., Pines, O., and Inouye, M. (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **55,** 569.

Gruber, J., Boese, G., Tuschl, T., Osburn, M., and Weber, K. (2004). RNA interference by osmotic lysis of pinosomes: Liposome-independent transfection of siRNAs into mammalian cells. *BioTechniques* **37,** 96.

Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans*, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81,** 611.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404,** 293.

Knecht, D. A., and Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236,** 1081.

Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2002). Efficient RNAi-mediated gene silencing in neuronal cells using Qiagen siRNA and TransMessenger transfection reagent. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. **99,** 11926.

Llave, C., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2000). Virus-encoded suppressor of post-transcriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97,** 13401.

Martinand, C, Salehzada, T., Silhol, M., Lebleu, B., and Bisbol, C. (1998). The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J. Interferon Cytokine Res.* **18,** 1031.

Merrett, A. F., Aufsatz, W., van Der Winden, J., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19,** 5194.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155,** 335.

Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51,** 263.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2,** 279.

Nishikura, K., and Murray, J. M. (1987). Antisense RNA of proto-oncogene *c-fos* blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 639.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16,** 948.

Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., and Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement of the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* **6,** 1077.

Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I., and Engelke, D. R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* **20,** 505.

Pélissier, T., and Wessenegger, M. (2000). A DNA target of 30bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* **6,** 55.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350.

Strayer, D. C., Carter, W. A., Brodsky, I., Gillespie, D. H., Greene, J. J., and Ts'o, P. O. (1982). Clinical studies with mismatched double-stranded RNA. *Tex. Rep. Biol. Med.* **41,** 663.

van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., and Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2,** 291.

Weil, D., Garçon, L., Harper, M., Duménil, D., Dautry, F., and Kress, M. (2002). Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *BioTechniques* **33,** 1244.

Wessenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sanger, H. L. (1994). RNA-direct *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76,** 567.

Yu, J-Y, DeRuiter, S. L., and Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99,** 6047.

Zamecnik, P. C., and Stephensen, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

75, 280.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101,** 25.

（金言译；金由辛校）

第 25 章　基因组、转录组、蛋白质组和生物信息学

25.1　基本原理

人类基因组计划已圆满完成。它揭示了细胞遗传图谱的结构和组织方式。测定人类基因组序列带来的好处之一，是让人们首次看到了人类基因组的超结构、序列以及结构上和其他物种之间存在的关联。过去，当突变引起疾病的发生、发展时，图位克隆（positional cloning，也就是通过在遗传图谱上确定其位置的方法来鉴定基因）就是不多的几种不甚精确的手段之一。由于正常人和携带/患病个体的 DNA 在经过一种或几种限制性内切酶切割后，可能产生不同的酶切片段。限制酶切片段长度多态性（RFLP）常被用来检出遗传紊乱高发的人群[1]。借助于基于 PCR 的自动检测方法，目前细菌、病毒、酵母、植物和动物的全基因组已被成功测序，而科学界也直接进入了后基因组时代。

以前未被完善定义的基因组功能学科（如编码 RNA 和蛋白质），现在正引起研究者日益增长的兴趣，如果不说成是狂热的话。而新出现的学科和亚学科又需要新的名称。目前，最流行的做法是在表示相关遗传信息或是分析方法的名词后面直接加上“组学”，即“-omics”的后缀。尽管这种做法可能望文生义、合理地猜出该学科的相关内容。但为了读者的便利，还是在此列出几个简要的工作定义。生物信息学是一个独特地混合了基础生物、遗传和信息科学的学科。因为涉及如何使用数字技术来分析 DNA 序列数据、RNA 和 cDNA 序列数据及蛋白质序列相关信息，生物信息学在诸多“组学”学科内显得稍有不同。由于超级计算机的出现，人们期待计算机模拟蛋白质组学（in silico proteomics）能日渐成为预测新生肽段折叠和功能的研究工具。而遗传组学、转录组学和蛋白质组学之间正如分子生物学的中心法则 DNA→RNA→蛋白质描述的那样，相互间存在着紧密的联系（见第 2 章）。

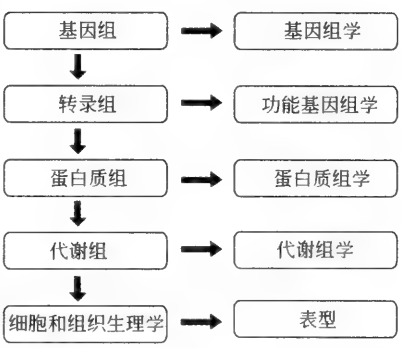


图 25.1　“组学”，基因表达不同功能性组分之间的关系。DNA 所编码的信息在所有水平井然有序地表达，就导致了细胞、组织和最终的生物体具有了某种特异可识别的特征

要牢记的是，DNA 序列信息只是整个故事的一部分。因为并非所有的基因组 DNA 都

[1] 并非所有遗传疾病都有 RFLP。

具有功能上的“作用”。再回忆一下，虽然 RNA 是检测到基因表达的一个参数，但是 RNA 同样不能表述整个故事，因为核内 hnRNA 会快速代谢，细胞质内的 mRNA 也未必都能被翻译。由于基因组总是稳定的，而细胞内的 RNA 和蛋白质却并非如此，所以研究 RNA 和蛋白质这两个水平上的表达数据，以获得特定条件下更完整的细胞生理认知是很有必要的(图 25.1)。

25.2 重要术语

accession number：编号。核酸序列（基因组 DNA 或 cDNA）或氨基酸序列（蛋白质）的数字标识。该编号相当于电子分类卡片目录，它有利于数据库的检索。

bioinformatics：生物信息学。计算机、信息技术以及生物工程学手段的结合，使用户可以对庞大的核酸和蛋白质序列信息进行分类和归档。生物信息学也扩展到了图像信息学的领域[1]，定量解释复合胶及芯片图像，并进行归档。

genome：基因组。细胞内染色体 DNA 的整体，被称为基因组。在某些操作中，需要区分细胞核基因组和线粒体基因组。

genomics：基因组学。对基因结构和组织的研究。基因组学的研究与 DNA 序列数据的获得密切相关。

chemical genomics：化学基因组学。用有机化合物对基因组进行化学操作，以信号途径被扰乱的细胞为材料，研究该处理带来的影响。

functional genomics：功能基因组学。对细胞内 RNA 水平的研究和对细胞因外界改变而在 RNA 水平进行调控的研究。狭义而言就是对基因表达的研究。

metabolome：代谢组。一个细胞或其他特定生物样品内所有的化学成分，即所有的代谢物。

metabolomics：代谢组学。化合物的代谢谱。研究各种蛋白质对代谢水平造成的影响。此类研究常常能揭示潜在的基因功能。

proteome：蛋白质组。某一特定时间内一个细胞所产生的所有的蛋白质；从全细胞抽提物中纯化翻译产物的全体集合。

proteomics：蛋白质组学。对特定生化条件下细胞内蛋白质组分的研究。研究目标包括：结构、功能、表达蛋白质的分布，以及自然或人为刺激下蛋白质类别如何进行变化。通过研究正常/疾病不同状态下细胞内的蛋白质功能及丰度，蛋白质组学建立了一种将蛋白质功能及丰度和基因组功能联系起来的系统手段。它有利于同时揭示多种蛋白质的功能。目前已成为新药研发的主要技术平台。

transcriptome：转录组。某一特定条件下某一特定细胞所产生的所有 mRNA。

transcriptomics：转录组学。对生物体所有转录本的研究，以及对细胞内环境改变时这些 mRNA 分子的表达如何改变进行的所有研究。

25.3 基因组与基因组学

对单一基因测序会生成许多信息，而对若干目的相关基因测序就会生成更大量的信

[1] IQBase（Media Cybernetics：www.mediacy.com）是就该项操作性能极好的软件。

息。要不是使用了强大高速的计算机和杰出的软件可以从数据库中查找出目标信息，整个基因组测序所产生的巨大信息量肯定不可能存在一种组织、分析、归档的方法可以让研究者轻易进行查询。生物信息学的功能之一，数据挖掘（data mining），就是有机地将信息科学和生物学结合在一起。精通这些领域的学生，可以期待在未来几年中拥有很好的职业前景。

基因组学的目标之一是阐明分布着离散基因的精确 DNA 图谱。一种基本的研究方法就是检查测得序列中的开放阅读框（open reading frame，ORF）。开放阅读框是一长段未被终止密码子打断的核酸，真正的开放阅读框包括起始密码子（ATG，也可能是 GTG，但出现频率较少）和一个终止密码子（TAA、TAG 或 TGA）。在真核细胞内，开放阅读框可能被打断成外显子编码区和内含子非编码区，这点根据高度保守的 5′GT 和 3′AG 剪接位点可以很容易识别出来。打断的基因，即包含了外显子和内含子序列的基因，只存在于真核细胞内。因此相比之下不含内含子的原核细胞拥有更经济的遗传信息。某些噬菌体（病毒）如 ΦX174[1]，甚至在同一区段 DNA 上使用两套不同的阅读框，重叠编码了两个基因。这并不是一个完全出乎预料的发现，因为：①虽然这一病毒的基因组很小（只有 5375nt），却必须制造所有指导病毒传代合成所必需的蛋白质；②总的来说经历了无数次复制的病毒，它们的基因组早已优化，实现了效率的最大化。

对大规模测序项目来说，因为最大插入片段的大小不能超过 50000bp，传统的噬菌粒和黏端质粒显得能力不足。而采用可以承载数十万核苷酸的特殊载体如 YAC（yeast artificial chromosome，酵母人工染色体）和 BAC（bacterial artificial chromosome，细菌人工染色体），则可以对复杂基因组进行有效作图。使用 BAC 或 YAC，不但允许对从启动子旁侧序列到调控元件的整个基因进行测序，而且有助于确认遗传位点之间的连锁关系。由于着重于基因组的结构和组织，以上方法都隶属于结构基因组学的范畴。与之不同的功能基因组学则更注重于基因表达的模式，即基因组的特殊组成。

25.4　转录组与转录组学

一个细胞所产生的所有 mRNA 就是它所具有的转录组。就广义来说，本书列举的大量分离定性 RNA 的方法，就是在讨论如何确认转录组的性质。目前，芯片分析（第 23 章）常被用来检测特定实验条件下基因的表达模式，以及在实验刺激下基因的表达改变。人们可以把芯片技术想象为一种精细化的点杂交分析——由细胞裂解这一刻表达的 mRNA 直接制备的 cDNA，与固定在固相支持层上的 cDNA 或寡核苷酸进行杂交的技术。

作为 mRNA 表达的镜像，cDNA 测序所得的数据也就反映了 mRNA 的复杂度和精确序列。反映表达的数据之一是表达序列标签（expressed sequence tag，EST）。EST 是源自细胞培养物、组织材料或 cDNA 文库（差减或其他处理之后的）或是其他生物来源（Adams 等，1991）的部分 cDNA 克隆序列。另一种方法是 20 世纪 90 年代发展出来的基因表达系列分析（serial analysis of gene expression，SAGE；Velculescu 等，1995），针对细胞内 mRNA 合成的极短 cDNA 分子（9～10bp）进行分析。作为标签的这些 cDNA，每一个分子代表了某个特定转录本的特定位置。这些标签在连接形成多联体以后很容易测序。某一特定标

[1] 根据历史记录，ΦX174 是最早完成测序的基因组（1977）。

签出现的频率就代表了相应 mRNA 的丰度。SAGE 是一种高通量的研究基因表达的方法；而传统的 EST 分析则需要对明显要长得多的 cDNA 进行测序。总的来说，EST 分析和 SAGE 都提供了涉及多种物种基因表达的大量信息，为若干高端数据库的发展奠定了基础。这些对基因表达谱的描述表明，许多基因可以产生一个以上的转录本，通过可变剪接或是转录起始位点（transcription start site，TSS）的选择，每种不同的转录本随之可以生成几种蛋白质异构体。

25.5 蛋白质组与蛋白质组学

与 DNA 或是 RNA 相比，蛋白质相对要复杂得多。目前的看法普遍认为，人类基因组大约共有 35000 个基因，最终共编码了 500000～1000000 个蛋白质。确实如此，因为翻译后共价修饰和加工过程，通常伴随着天然蛋白质的整个成熟过程。翻译后加工事件包括糖基化、乙酰化、异戊二烯化、磷酸化、蛋白质裂解过程和复杂的蛋白质-蛋白质相互作用。蛋白质组是动态的，尤其是在真核细胞里。这使得对它的检测过程更为复杂。因此，蛋白质组学的研究，对识别基因功能非常重要。并且，现在的蛋白质组学已不再是一次分析一个蛋白质，而是发展到对细胞或组织总体蛋白质的表达模式进行分析。蛋白质信息学已经成为生物信息学中一个专门的亚分科。

细胞类型（原核、植物、动物或酵母）决定了抽提蛋白质时裂解细胞的方式：机械裂解、酶消化裂解、匀浆、去垢剂处理或研磨。所有以上技术早已被详细描述，在购买各种蛋白质纯化试剂或试剂盒时，生物技术供应商会提供相应的简要操作指南。

1975 年提出的双向（2D）凝胶电泳（Klose，1975；O'Farrell，1975）是初步扫描蛋白质组的工具之一。首先按等电点（p*I*，蛋白质不带电荷时的 pH）分离蛋白质。经第一向分离之后的样品再进行垂直电泳。在第二向中按大小分离。双向电泳可以同时分离数千种蛋白质，每种蛋白质显示为不同的点。双向凝胶就像是样品的指纹，各点的大小和相应蛋白质的丰度成正比。与 RNA 一样，细胞内各种蛋白质的丰度不同。因此，对双向凝胶电泳中相邻的两点如何保证避免超高丰度蛋白质对低丰度蛋白质的屏蔽就很重要。为了提高对蛋白质组的分辨率，目前有几种策略可将全细胞裂解物分部分离（Corthals 等，2000；Zuo 和 Speicher，2000）。这些广泛被采用的方法都基于分部分离的策略来简化对样品的分析。有专门用于分析双向凝胶电泳图像的软件，可自动识别和对所分离的点进行定量。这一图像信息学方法，就提供了对图像进行电子归档的方法。

此后，回收双向凝胶电泳上各个点的特定蛋白质。用蛋白质裂解酶消化这些点里的蛋白质，就产生了许多较小的、可用质谱鉴定的肽段，也就是常见的基质辅助激光解吸电离飞行时间（matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight，MALDI）分析。自 20 世纪 80 年代发展起来之后，MALDI 就成了蛋白质组学的重要工具。因为 DNA 编码了所有可能存在的蛋白质，人们就能将 MALDI 鉴定出的氨基酸序列与已知遗传位点的核苷酸序列进行比对。但是，确认编码了某蛋白质的基因物理图谱并不代表就了解了它的功能。蛋白质功能的阐明通常是非常困难的，因为某特定蛋白质可能与其他蛋白质协同发挥作用，它也可能只是一个巨大的蛋白质复合物的一个组分。

目前用来鉴定蛋白质功能的策略有几种，如酵母双杂交、各种免疫亲和捕获技术、核磁共振（NMR）、结晶、毛细管电泳、高压液相色谱（HPLC）以及新兴的检测蛋白质-蛋白质

和蛋白质-脂类相互作用的蛋白质芯片（也被称为蛋白质微阵列）。现在正在制备的还有，含数百种代表一系列生物功能的单克隆抗体的抗体芯片。其中一些有主题的芯片专一针对不同的感染疾病、肿瘤和细胞凋亡。一种检测蛋白质表达常用的做法是，用 Cy3 和 Cy5 标记某生物来源的蛋白质，再将标记蛋白质与抗体芯片杂交。更为传统的蛋白质组学研究手段有不同的转录-翻译系统，如麦胚抽提物、兔网织红细胞裂解物、犬胰微粒体膜和蛋白酶。

虽然蛋白质组学数据库的数量增长很快，但与 GenBank 和其他公共数据库不同的是，访问某些私有的蛋白质组学数据库时，需要经过许可和/或交付访问费用。这些费用用于数据库的日常维护和发展。对蛋白质组学这一行的新手来说，推荐的专业机构有蛋白质组协会（the Proteome Society；www. proteome. org）、基因表达芯片数据协会（the Microarray Gene Expression Data Society；www. mged. org）和人类蛋白质组组织（the Human Proteome Organization；www. hupo. org）。此外，蛋白质的翻译后修饰及其研究方法也因此受到高度重视（Hames 和 Higgins，1999；Liebler，2001；Kannicht，2002）。

在此值得一提的是，不同氨基酸序列、不同翻译后修饰的多肽，与 DNA 和 RNA 寡核苷酸一样可以定制。这些定制合成的多肽可以用来在免疫学应用于对抗原决定簇作图，鉴定新药的活性肽段，鉴定酶的底物和抑制物，鉴别蛋白质-蛋白质的相互作用，鉴别蛋白质-核酸的相互作用，为疫苗研究发展新的抗体。

研究细胞、血液或其他体液内重要成分组成的代谢组学是蛋白质组学的合理延伸。与蛋白质组学不同，代谢组学所关注的是细胞内各种蛋白质引起的变化。这些变化直接和蛋白质的翻译后修饰及微环境相关。代谢组学产生于 30 多年之前，现在因日益增长大量的蛋白质序列数据而复兴。代谢组学有助于评估药物的毒性、潜在副作用和整体安全性。用于代谢组研究的方法有 NMR、质谱分析、各种传统的液相色谱和气相色谱技术。

25.6　生物信息学

核酸和蛋白质序列的海量数据每天都在增加，其中的绝大多数会进入公用数据库。为使这些数据能被任何人所用，同时能提供支持对数据库的询问和搜索的软件，特此成立了美国国家生物技术信息中心（National Center of Biotechnology Information，NCBI；Bethesda，马里兰州）。欧洲分子生物学试验室（European Molecular Biology Laboratory，EMBL；德国，海德堡）和日本 DNA 数据库（DNA Data Bank of Japan，DDBJ；Mishima，日本）与 NCBI 共同协作为世界各地的研究者们提供了对海量数据[1]的访问途径。此外，用户还可以便捷地访问一些专业化数据库，如加注的蛋白质序列库基因组研究所（The Institute for Genome Research，TIGR）和 Swiss-Prot。表 25.1 中罗列了一些重要的生物信息学网站。

在 NCBI 的主页上就可以搜索到特异的 DNA 序列（Entrez）、目标基因所在的染色体位置（Human Map Viewer）和特定基因的相关科学文献（PubMed）。另外，还提供了一些读者应该了解和熟悉的软件工具。

---

[1] 截至 2004 年 5 月，GenBank 数据库包含了 366 亿碱基对的序列数据，代表了大约 3 千万个不同的序列。访问 www. ncbi. nih. gov/genbank/genbankstats. html，可以了解当今最新的数据。

表 25.1 重要的生物信息学网站

NCBI	www. ncbi. nlm. nih. gov
EMBL	www. embl. org
DDBJ	www. ddbj. nig. ac. jp
TIGR	www. tigr. org
Swiss-Prot	http://us. expasy. org/sprot
Codon utilization tables	http://www. kazusa. or. jp/codon/

来自于基因组测序、cDNA 测序和蛋白质测序的信息与日俱增，对希望使用这些信息的研究者而言，不啻为令人生畏的挑战——怎样才能对含有数以亿计的碱基序列的信息数据库有效地进行搜索并获得特定的情报？为此很多程序应运而生，而问题因此也被简化为对 DNA 序列或蛋白质序列进行搜索和鉴定。其中最有名的就是被称作 BLAST 的基本局部比对搜索工具（Basic Local Alignment Search Tool）。这是一个功能强大而多样的软件，能够从数据库中搜索出与输入序列一致的核酸序列或蛋白质序列，同时显示两个序列的比对结果。另一个受欢迎的软件是 GRAIL（compbio. ornl. gov/public/tools），它能从用户提供的 DNA 序列中鉴别出完整的基因、外显子及其他特征。

BLAST 可在网上直接使用（www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST）。其他不少网站也给出了 BLAST 的链接。用 BLAST 进行搜索的过程很简单，最直接的方法就是选择核酸对核酸的 BLAST（blastn）。用户需要输入搜索字符串，也就是希望研究的核酸序列。输入字符串既可以手动输入，也可以通过拷贝和粘贴来实现。手动输入时因为大写的 C 和 G 可能发生混淆，所以可以选择在搜索框中输入小写的 a、g、c、t 碱基序列。用户可以搜索未知序列的全部或是部分，后者可通过在“FROM”和“TO”窗口中输入起始和终止核酸位置来完成。用户可以选择搜索使用的数据库，但是对于新用户而言，除非有特殊需要，否则最好还是使用缺省设置的非冗余核酸库“nr”，这样可以执行最完整的搜索[1]。最后，点击 BLAST 图标即开始搜索。由于若干可变因素，搜索可能需要几秒到几小时来完成。BLAST 会估计搜索所需的时间并给出一个 RID 号（询问号），这是一个重要的数据传输索引号。接着，用户可以点击“Format”键，进而打开显示 BLAST 搜索结果的窗口。在最终的搜索结果中，每个序列都配有两个数值，一个是 S（位值），反映了用户提供的序列和从数据库中搜索得到的一致序列之间吻合数的统计值；另一个是 E（期望值），它反映了找寻到同样 S 值序列的可能性。所以，对任何 BLAST 搜索，得到的 S 值越高 E 值越小（应远低于 1.0），说明序列的吻合度越高。

用户可以随时登陆前面提到的网站，用各种信息工具进行练习，来熟悉如何正确有效地使用 BLAST。用已知的序列进行第一次实践是比较方便的方式，如自己试验室中研究的基因有关的序列，或者用来扩增这个基因某一区段的 PCR 引物序列。或者为了熟悉搜索过程，也可以自己编造一段序列。

如果没有可以用来搜索的 DNA 序列，NCBI 网站也提供了其他扩展资源。其中令人印象深刻的是 NCBI 不但给出了与发病或疾病进程相关的基因，甚至显示了详细的遗传连锁图。另外，还可以找到一些检查蛋白质序列的工具和基于 X 射线晶体学数据的蛋白质三维结构。这些资源大多数是免费开放的。访问这个网站探索各种可能，对研究绝对是

[1] 一些生物物种的 EST 或其他特定的数据也可供挑选。

非常有启发的。

25.7 参考文献

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., McCombie, W. R., and Venter, J. C. (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252,** 1651.

Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2000). The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21,** 1104.

Higgins, S. J., and Hames, B. D. (1999). "Post-Translational Processing: A Practical Approach." Oxford University Press, New York, NY.

Kannicht, C. (2002). "Post-Translational Modification of Proteins: Tools for Functional Proteomics." Humana Press, Totowa, NJ.

Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26,** 231.

Liebler, D. C. (2001). "Introduction to Proteomics." Humana Press, Totowa, NJ.

O'Farrell, P. H. (1975). High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250,** 4007.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinsler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270,** 484.

Zuo, X., and Speicher, D. W. (2000). A method of global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.* **284,** 266.

（金言译；金由辛校）

第 26 章　一个 RNA 范例

前面章节谈到的实验方案，描述了从不同生物来源的材料中如何有效分离 RNA 的种种方法。明智地将这些技术加以组合并付诸应用，就可以系统地认识转录产物在基因表达调控中所起的作用。检测特殊信使 RNA（mRNA）的水平作为基因表达的一个参数，在任何一个实验模型中都是极为可取的。而在此基础上，再使用 Western 分析等免疫化学实验方法对蛋白质的表达进行检测，则可更完整地阐述就实验探讨条件下的基因调控。一个典型的基于 RNA 的实验设计，包括获得稳定的 RNA，（也许需要）测定对照组和实验组细胞的转录速率。利用这些手段就可以判定，实验所观测到的某一（些）mRNA 的改变是转录水平发生了变化，还是转录后事件所造成的变化。

研究者可以对细胞质 RNA 进行 Northern 分析，直接检测整体转录本或部分转录本。而分别对细胞核 RNA 和细胞质 RNA 进行研究，则可以确认基因表达的调控是发生在转录水平，还是发生在转录后水平。经典的 Northern 分析有它的局限性，用物理方法将靶 RNA 固定在尼龙膜之类的支持物上，这就阻碍了 RNA 分子与核酸探针之间的全面接触。但是，Northern 分析本身就能揭示 mRNA 的长度，检测 RNA 在细胞中被表达时的天然全长。而所有其他用于 RNA 分析的方法，无论听上去有多高的技术含量，都只对转录本全长的一部分进行了分析。

更全面的转录本量化分析的方法，有以 S1 核酸酶和 RNase 保护实验为代表的液相杂交，此外当然还有聚合酶链反应（PCR）。由于这些技术的灵敏度都有很大提高，因此不再必须对 poly(A)$^+$ 的 RNA 进行纯化。PCR 技术的出现，使得不再需要对天然产物进行富集处理，甚至富集也无法再满足实验的需要。尽管如此，对 poly(A)$^+$ 和 poly(A)$^-$ 的 RNA 并行地进行分析，依然是对所研究的 mRNA 进行富集极好的方法。这些实验的结果常通过放射自显影、化学发光或 Cerenkov 计数法加以定量，并可进一步与数据图形分析相结合。由于 RNA 的特性是最常被用来评估基因表达的方法，人们总是希望能获得更高的灵敏度。在过去的 15 年中，PCR 技术已极大地推动了对细胞生物化学的探查深度。而对此项技术的若干改变，则使之具有持续的越来越广的应用前景。

通常文献报道在提及转录诱导或阻遏时用术语“相对丰度”来表达，即比较测得的对照组及实验组细胞中某特定 RNA 种类含量后的相对数值。例如，可能会出现这样的报道声称在某个新获得的细胞系中，与处于指数生长并且未汇聚的同类细胞中肿瘤基因 *c-myc* 的丰度相比，接触抑制导致 *c-myc* 的丰度下降了 $\frac{1}{50}$。因此，可以在不清楚某一转录本在细胞中的绝对数量时，作给出该转录本增多或是减少的陈述。如果愿意，该样本的确切数量也可以通过

和已知数量的起始物质相比的实时 PCR 精确测得。

模式系统的分子研究不必停止在对转录的特性分析上。在分析了转录产物的即时状况，或是用核逃逸实验测定了不同基因的转录速率以后，研究者可能会希望研究导致那些观察到的差异的分子基础。毕竟，基因表达只是 RNA 生物发生的一个部分。在基因组组织的这个层次上，对 mRNA 的调控可能是（至少部分而言）基因重排的结果。导致转录本量上变化的影响因素极有可能就是某一位点的编码部分内发生的错误，或是影响了基因表达的侧翼序列。随后的研究可以利用 Southern 分析法来研究此类结构上的变化。由于人类等物种的基因组全序列已测定，生物信息学方面的工作有助于对这一类型的调控进行分析。

同样，在细胞水平上基因的表达最终以功能性多肽的形式告终。为了对实验系统给出一个更为清晰的定义，对基因表达的翻译调控和翻译后调控进行定性也是有帮助的。尽管一种或另一种 mRNA 的出现就提示它们会被翻译，但由实验所引入的细胞生物学变化可能会危及这一 mRNA 转运到翻译机器的过程，因此随后应该用 Western 分析来验证。作为 Western 分析的补充，近年来出现的新技术——RNA 干扰（RNAi），完全可以用来对此类问题进行研究。大家一定还记得，通常与真核基因表达有关的翻译后修饰，也可能被某特殊实验条件所定义的参数改变。所有新兴的蛋白质组研究方法，都有助于研究者对蛋白质的成熟以及最终基因的功能有更清晰的认识。因此，从若干方面进行细胞生物学鉴定是较为适宜的。

26.1　典型实验

并没有什么所谓的典型实验。在为某个特定问题耗费不计其数的工作时间、成千上万的美元，投入各种各样昂贵的试剂盒以及种种高科技手段之前，对新系统作一个简单的起始定性总是个聪明的做法（图 26.1）。需要一些“快而低廉”的方法直接对讨论模型的功能进行评估。例如，为了分析数量众多或是采集自若干时间点的样本，只要转录本足够多，那么仅用斑点印迹这么简单的方法就能很容易地达到目的。虽然与经电泳分离后的 RNA 相比，使用斑点印迹会损失一些 RNA 性质上的认识。近年来人们对极低丰度转录本产生了巨大的研究兴趣，如果在实验中未能检测到已确认为 cDNA 的序列转录，那么就有必要对原有的实验设计进行修改。实验中潜在的改动包括：①换一种 RNA 纯化的方法；②换一种生物材

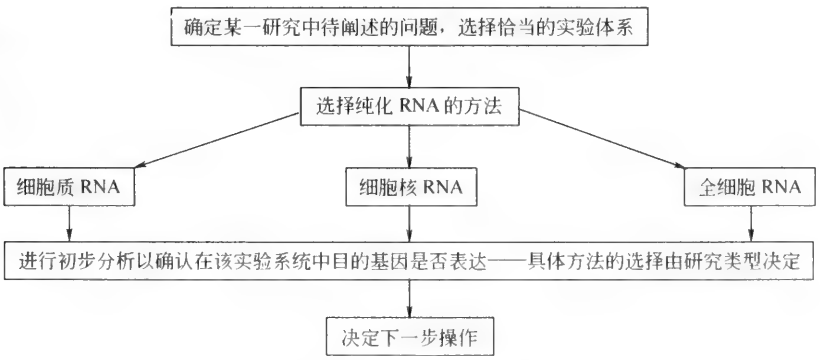


图 26.1　初步分析以决定选定的实验系统是否合适。机构内现有的装备、技术以及待解决问题的本质决定了什么才是最为合理的“快而低廉”手段。初步分析能给出的最重要的信息也许就是判断研究者是否能从这一生物来源得到足以支持预计实验所需充足的高质量 RNA

料；③选用更敏感的实验方法；④用化学药品或生理刺激诱导目的基因的表达。

由于许多转录的 RNA 在细胞核内便已降解，如核不均一 RNA（heterogeneous nuclear RNA，hnRNA）不再会成熟并以 mRNA 的形式出现在细胞质中。因此在最初的定性实验中，对总细胞 RNA 和总细胞质 RNA 都进行分析是非常有益的。并且，如果某一探针可以与总细胞 RNA 而非细胞质 RNA 杂交，这就暗示有某种转录后调控机制在发挥作用。在最初评估给出了振奋人心的数据之后，再对此系统进行更为细致的分析是比较合适的做法。

尽管有其他灵敏度高得多的定量方法，几乎没有研究者会为了定量来使用 Northern 技术，历史悠久的 Northern 分析仍是一个用于检测转录本大小的方法（图 26.2）。通过 Northern 分析，可以了解转录本的大小及其丰度。既可以证明所选用探针的特异性，又可以在大小及丰度上和已发表数据（如果有的话）作直接比较。但是研究者们必须注意，标准的印迹分析无法检测到大量正在被研究着的基因；低丰度和极低丰度的转录本仍常常低于 Northern 分析的检测水平。在进行 Northern 分析的同时进行 PCR 分析，以评价前者数据的可信度，这才是明智之举。这样的操作将证明在印迹法无法检测到信号的时候，样本中的 RNA 仍可以被检测到（在质量足够高的条件下）。

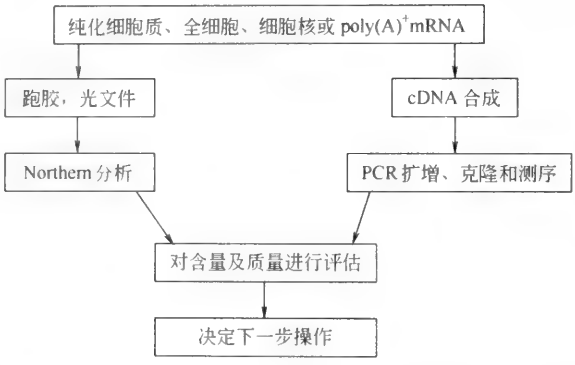


图 26.2　Northern 分析可用于测定天然转录本的大小及寻找同一基因的多个转录本（multiple transcripts）。通常建议对同一 RNA 样品做一些基于 PCR 技术的平行实验。这种策略在转录本丰度低于 Northern 分析的检测水平时将带来巨大的帮助

如前所述，检测转录本的更为灵敏的定量方法是那些基于液相杂交的技术，如核酸酶保护实验、各种芯片和基于 PCR 技术的实验（图 26.3）。比较深思熟虑的做法还包括设计一个或几个测定对照组及测定实验组细胞中转录速度的实验，如核逃逸实验。把转录速度与 Northern 分析以及 RT PCR 的结果一起衡量可以得出结论。数据显示的基因表达变化也可能是来自结构变化、来自位点重排或来自侧翼的调控元件影响的结果。这些可能性可以用 Southern 分析来验证。

PCR 技术一直因其高灵敏度和分辨率而受到极高的评价。事实上在任何实验背景下，凭借这一革命性的手段对 cDNA 和基因组 DNA 序列进行扩增都是检测转录最为可靠的方法之一。PCR 确实需要知道转录本或特定基因的序列以期设计出有效的引物序列，而本书所提供的若干策略和网上的大量生物信息学工具都可胜任这个要求。尽管在测定基因表达时 RT PCR 可以作为一个独立指标，但是用一些先前所述的更为经典的方法来确证一下不失为明智之举。

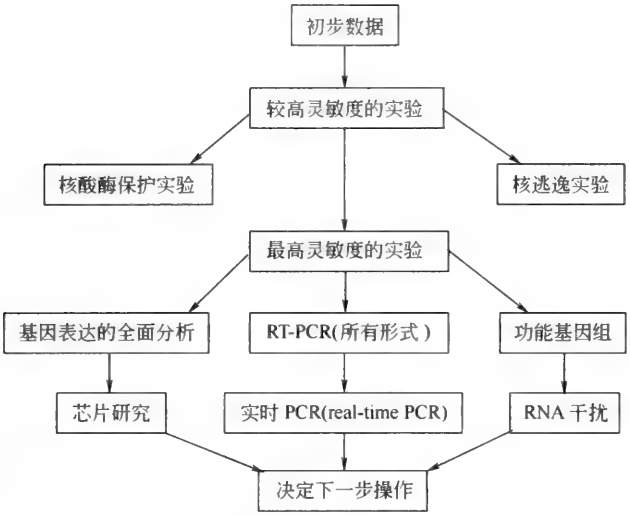


图 26.3　与基于滤膜为基础的实验（如 Northern 分析）相比，核酸酶保护实验和核逃逸实验的灵敏度更高。为了追求实验范围、灵敏度和分辨率的最大化，以及考虑到技术之间的互补，芯片筛选、实时 PCR 和阻遏基因表达的 RNA 干扰技术都是极完美艺术级的方法

26.2　灵敏度的问题

本实验指南列举了一系列 RNA 纯化及定性的方法论。需要注意的是这些方法各有利弊，因此有必要讨论一下具体方法的可靠性和灵敏度。

通常以相对丰度的形式来表述源自同一实验系列样本的 RNA 水平，这也就是说其中的对照或是基线组被人为地指定为数值 1，以此作为其他实验样本的比较依据。需要注意的是测得的相对丰度直接影响到随后实验的相对灵敏度：为求相同目的对同一组样品使用不同的测试方法，其结果也往往会有大得难以想象的差别。

第 20 章的 RNA 灵敏度指标中从最高的实时 PCR 到最低的斑点印迹，列出了几种常用转录实验方法的相对灵敏度。但即使是灵敏度较低的实验技术也能提供有用的信息。比如，传统的转录测试技术 Northern 分析可以显示在特定位点产生的 mRNA 的天然大小，而这一数据是那些具有更高灵敏度的方法所不能提供的。

26.3　有待进行的

只有在观察到上调或是被阻遏的基础上，才能决定是否要对关注的那些 RNA 投入更多的实验资源，是否值得对这些“现象”进行更深入的分析。就这一点而言，由 RNA 不稳定性造成的习惯，实验室往往倾向于新合成相应的 cDNA，或是翻出以前就有的 cDNA 文库。得到特定基因的 cDNA 不仅以后可以作为序列探针使用，而且在许多推荐进行的实验中也用得到（这些都将在本章逐一提及）。此外，由于 cDNA 克隆极易测序，任何人都可以利用网上的生物信息学资源轻松鉴定出该基因的来源。

如果已经有了合适的 cDNA 文库，那么目的 cDNA 就很可能藏身其中，这可以让研究

者节省大量的时间和金钱。但是，研究者们必须提防那些古老的文库，介于 20 世纪 80 年代早期至 90 年代中期构建的文库，由于严重缺乏较长序列的克隆，不如近年来构建的文库那样富有代表性。造成这种局面的原因主要有两个。第一，早期的文库通常是用 oligo(dT) 作引物，以 poly(A)$^+$ mRNA 为模板合成的。使用这种引物模式往往造成第一链 cDNA 的合成效率低下，这就显著缩短了 cDNA 分子的长度并减少了 cDNA 的多样性。一旦缺少了探针检测的区域，显然杂交反应就不会有信号显示。甚至会有更为极端的例子，比如文库中可能就根本不包括若干种 mRNA。第二，用 oligo(dT) 作引物构建的文库，只能代表部分的 RNA 构成，这是因为该文库不能反应 poly(A)$^+$ mRNA 的组成。更为合理的做法如第 18 章所述，在用 oligo(dT) 作引物合成第一链 cDNA 的同时添加随机引物使反应完全。事实上，仅用 PCR 方法即可完成构建整个文库的要求。

筛选文库的工作可以用传统方法完成。比如先将文库铺板，然后再用核酸探针或是抗体（如果条件允许）进行平板筛选实验（plaque screening assay）。在掌握一些序列相关情况时，比如已有一些对同一基因家族其他成员的研究或是基于对其他物种内同一基因的了解，也可以尝试着合成引物，用 PCR 的方法从文库中筛出目的基因。如果传统的文库筛选和/或 PCR 的方法都不能成功地从文库中得到特定基因，那么可以重新设计探针、引物，或是干脆构建一个新的 cDNA 文库。一个 cDNA 文库的用途和意义就在于它是一个可以永久保存的代表着细胞在裂解那一瞬间的生化记录。

无论是从文库或其他途径，一旦得到了 cDNA 序列就可以扩增作为探针，用于 Northern 或 Southern 分析、核酸酶保护实验、DNA 测序及其他很多实验。由于大量真核生物基因组处在转录沉默的状态，因此对 cDNA 进行测序就是一种确认离散位点和度量遗传表达的惠而不费的方法。新发现的 cDNA 序列不断地增补到 GenBank，而其相关信息又可用来设计 PCR 引物，这极大地促进了寻求对应基因组 DNA 等更深入的探索。除此之外，要针对研究中所提出的特定问题来设计实验。由于基因表达是个多重性的现象，之后的研究可能涉及以下列出的这些领域（当然不仅限于这些领域）。

① 确认特定实验条件下某基因的转录起始位点（transcription start site，TSS）。

② 利用 RNA 干扰技术探索某基因的确切功能。

③ 针对某基因设计可用于诊断的 PCR 引物。

④ 从基因组文库中搜集 DNA 片段以重现整个基因。

⑤ 确认该研究位点的外显子-内含子的结构。

⑥ 确定 hnRNA 的剪接模式。

⑦ 进行凝胶阻滞实验和 DNA 足迹实验，分析该位点侧翼序列中潜在的调控序列和蛋白质结合位点。

⑧ 对疑似调控序列进行点突变分析。

⑨ 进行原位杂交或原位 PCR，确认表达该目标基因的细胞的组织分布。

⑩ 确认该基因蛋白质产物在细胞内的分布情况。

⑪ 为临床及生物物理研究，在原核和真核蛋白质表达系统中高水平表达该基因产物。

⑫ 以过量表达的方法研究该基因在细胞或器官中非正常表达所造成的影响。

⑬ 使用报告基因对推测的调控元件进行研究。

⑭ 在未分化细胞中对该基因进行同源重组，以检查该位点在发育和分化中的作用。

⑮ 负责地构建转基因动物，以期在体内产生救生药物。

26.4　到哪儿去寻求帮助

在这到处都是技术的年代，利用生物信息学、e-mail 以及所有网上能找到的工具，人们无需离开桌前就可以轻易地搜索文献进行大量的背景阅读。PubMed 是一个可以快速获得大量科技文献的途径，接通美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）网站（www. ncbi. nlm. nih. gov）或是直接在浏览器中键入 www. pubmed. com 都可以得到 PubMed 的资源。

在一些独特的基于互联网的 BBS 上，遇到难题的科学家们可以贴出问题以期得到读者的回答。但是，千万不要过于相信你看到的东西，尤其是在互联网上。定期访问这类提问回答式的网站，常能发现问题总是不成比例地被某一些人回答了，这使笔者对这些显然是有大把空闲时间的人的观点颇为怀疑。

拨打免费电话可以联系到大多数生物技术公司的技术服务部门，附录 15 中就列出了许多公司的联系方式。你可以尽量利用他们的技术服务，在产品不能像广告所说的那样工作时要求替换。并且，在首次购买某个新的试剂（盒）时，不要耻于与公司沟通要求一个大大的折扣，因为这能使实验室有机会用最小的代价尝试一些新的东西。所有的供应商都明白，如果这个试剂盒的效果很好，显然以后客户仍然会购买这个试剂盒及其相关的产品。要有礼有节。

更让人愉快的是大多数供应商都在网站上给出了实验流程和用户指南，基本都是 . pdf 格式。那些靠着邮递或是 FAX 眼巴巴地等用户指南的日子一去不复返了。考虑到只有需要的恰当的产品才能提高实验室的产出，打印一份用户指南放在桌子上是很容易事。

为了兴建新实验室，或是为了扩展原有实验室的操作，甚而只是为了想知道哪一个供应商能提供什么样的产品，有两个网络资源都是很好的。一个是 www. biosupply. net，你几乎能在这儿找到所有你想要的东西。尽管付了提名费的公司会被列为“重要公司”，但是只要有这个产品凡是在 Biosupplynet 上注册过的供应商都会被列出。另一个颇有价值的网络资源是 Linscott 免疫和生物试剂目录（www. linscottsdirectory. com）。虽然使用这两个收录全面的推荐网站可能更省时省力，当然你也可以在搜索引擎里键入目的产品名称进行查询。

最后，有些公司致力于生物技术的培训。这些公司专门从事实验室密集性操作（hands-on）训练。大多数此类研讨会由那些在实验桌前工作、拥有博士资格的科学家负责。某些研讨会只关注某一特定的主题，而另一些研讨会则就众多技术进行广泛讨论。要特别指出的是，www. DNAtech. com 上通常会列出一些杰出的定期召开的研讨会。

（金言译；金由辛校）

尾　声

智慧的结晶

针对各种各样的研究问题，目前分子生物学其实只拥有二十多种革新性的标准反应。其中大部分都已在本书中一一论及。掌握了这些技术，在研究中可发挥的潜力是巨大的。分子生物学并不只是应用试剂盒，而是要计划和决定如何最好地利用和掌握这些工具来完成预定的目标。深思熟虑设计的研究策略，以合理的次序应用正确的技术，最终将决定性地影响研究结果。关于这点，请记住笔者所说的分子生物学的 5R 原则：快速（rapid）、有代表性（representative）、可重复（reproducible）、无 RNase 污染（RNase-free）、可信（reliable）。

① 不要用有粉末的手套。粉末会抑制 PCR，增加膜上核酸杂交实验的背景，引起混乱。

② 仔细阅读标签。就像人们不愿意服用不当的药物一样，用错试剂会立刻终结你的实验。所以，最好重复阅读标签加以确认。

③ 准备常用缓冲液的配方卡片。在试剂短缺或是必须在实验中间快速配制该缓冲液时，手边备有这样一张卡片就可以节省大量时间。

④ 检测制备核酸是否完整，最简单的方法就是凝胶电泳。取少许样品做一个微型凝胶分析（如 7cm×8cm）就能评估该样品在后续实验中是否可用。在实验过程中可用系列取样来检测 RNA 是否发生降解，变性是否完全，是否有效地反转录成 cDNA 等。

⑤ 加入样品后，如果含溴酚蓝的上样缓冲液从蓝色变成了绿色，也就是说反应管内的 pH 发生了很大改变，样品的完整性就非常可疑。

⑥ 使用甲醛作为 RNA 的变性剂，千万要注意如果甲醛的 pH 小于 4.0 时，RNA 会快速降解。记住在每次使用甲醛或甲酰胺时，取出要用的部分进行去离子处理（见附录 7）。

⑦ 如果用二甲基亚砜（DMSO）和乙二醛作为 RNA 变性剂，尤其在做斑点印迹时，记住 DMSO 会溶解硝酸纤维素膜。

⑧ 沉淀下来的 RNA 对管壁的附着不如 DNA 那样牢固。所以在倒去上清液时，一定要看清楚，保证 RNA 不被倒掉。也可以将上清液收集在另一个新的反应管里，这样即使 RNA 沉淀滑出试管也不会造成丢失。

⑨ 吸取微升级的溶液后，先将各种试剂加在反应管接近底部而非管底的内壁，再短暂离心使其混合。这样，既可以避免因毛细作用而引起的体积误差，也容易确认是否确实加入了这么小体积的溶液。

⑩ 实验室所有母液和工作溶液的标签上，除标明配制日期外，还应标明过期日期。使用前务必检查是否过期。使用过期溶液的严重后果是，会在无意中引入由生长在瓶内的微生

物所释放的 RNase。

⑪ RNA 制备过程中除非实验方法特别注明，务必将含有样品的反应管放置在冰上。阅读实验方法确认下一个步骤时，要记住先把样品放在冰上。连续抽提时先将反应管预冷，也会很有帮助。记住低温可部分抑制核酸酶的活性。

⑫ 用合理的方法保存核酸，尤其是 RNA，尽量保证核酸的高浓度。这样有利于进行紫外分光光度测定和以后的稀释。并且因为管底部形状各异，与 2.2ml 管或更大的 Corex 管相比，更容易从 1.7ml 反应管中用最小体积回收小量的 RNA。

⑬ 用 70%乙醇清洗以去除核酸沉淀中的盐。由于核酸分子可与盐形成凝聚物，明显降低了它们在乙醇里的溶解度，因此这一步清洗是相当必要的。管底部的沉淀包含了盐和核酸，用 70%乙醇既可除去大部分的盐又不足以溶解其中的核酸。如此洗涤 2～3 次之后，再用 95%乙醇清洗可加快沉淀的干燥速度。

⑭ 除非实验方法特别注明，不要使核酸沉淀完全干燥。与完全干燥的核酸样品相比，略含乙醇的 RNA 和 DNA 沉淀更容易溶解。

⑮ 购买重蒸过的苯酚（分子生物学级别）。苯酚的重蒸过程很危险，而高级别的重蒸苯酚可从很多供应商处购得。实验室的标准程序，就是到货后将苯酚融解，分装成 25ml 的小份，置于－20℃保存直至使用（附录 3）。这样可以避免苯酚的重复冻融，而有利于实验。

⑯ 在用有机溶剂去除蛋白质抽提核酸的过程中，不触及中间层的蛋白质而定量回收水相部分 RNA 通常是比较困难的。在取出大部分样品之后，为了能最大限度回收水相，可以将反应管 45°角倾斜，使剩余的水相部分靠近管壁形成液泡（图 1）。将枪头沿着反应管内壁滑动并刺液泡，小心不要触及中间层的蛋白质和有机相，吸取剩余的水相部分。

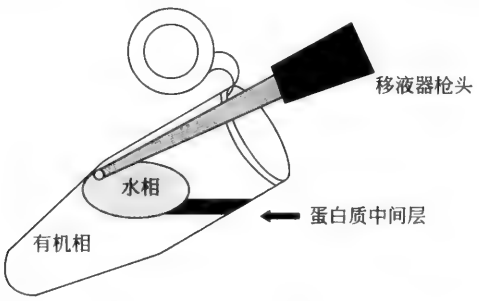


图 1　有机溶剂抽提时定量回收水相材料的技术。注意对眼睛和皮肤进行适当防护

当心　如此对含有有机溶剂的反应管进行操作需要特别小心。应该对眼睛和皮肤进行适当防护。

⑰ 用苯酚纯化核酸时，最后需要用氯仿或氯仿/异戊醇（24∶1）混合物再进行一次抽提。由于苯酚在氯仿中的溶解度极高，即使是痕量的残余苯酚，在最后一次氯仿抽提中也可以去除干净。需要进行这一步抽提，是因为苯酚的氧化产物（苯醌）会影响核酸样品的完整性。

⑱ 使用有机溶剂时不要选用聚苯乙烯制品（如离心管、血清用枪头），因为它们会溶于苯酚或氯仿，很难从样品中除去。

⑲ 检查 β-巯基乙醇和超速离心管的塑料类型是否兼容。

⑳ 通常在缓冲液内加入十二烷基硫酸钠（SDS）以控制核酸酶的活力。因为 SDS 会在低温下析出，许多操作中不使用 SDS 可能更好（SDS 钠盐尤其难溶）；并且对后续操作而

言，痕量的 SDS 也可能抑制所要进行的反应。其他类型的 RNase 抑制剂如 RNasin 可以作为 SDS 的替代物。

㉑ 在准备含有乙二胺四乙酸（EDTA）的缓冲液或试剂时，注意使用二钠盐（Na_2-EDTA）而非四钠盐（Na_4-EDTA）。因为很多分子生物学中的酶对盐浓度非常敏感，所以这一点非常重要。与 Na_2-EDTA 相比，用 Na_4-EDTA 配制的缓冲液显得碱性更大，用 HCl 调节 pH 至 7～8，将使 NaCl 的浓度增高，可能对实验结果造成负面影响。

㉒ 除了 RNase 与 RNA 的纯化有关之外，要注意重金属的长期存在也会导致 RNA 的降解。在怀疑发生这种问题时，可以用 Chelex（Bio-Rad）过滤缓冲液。此外，使用 8-羟基喹啉（重金属的螯合剂）也可以部分抑制 RNase，优化 RNA 纯化的效率。

㉓ 使用特定的离心管离心收集核酸沉淀时，注意不要超过该离心管的推荐转速（g）。在按比例放大或缩小 RNA 纯化规模时，因为方法中对转速（g）有明确要求，尤其需要注意这点。较小规模操作时，基本都使用聚丙烯微量离心管；较大规模操作时，可选用经恰当处理无核酸酶污染的 Corex 玻璃管，它们都能够承受沉淀 RNA 所需的离心力。

㉔ 没有什么统一的最佳储存条件。不同用途对 RNA 或 DNA 的质量要求各不相同。在不清楚适合条件时，纯化了的 RNA 最好以沉淀状态储存在－80℃。在紫外分析和决定样品命运之前，就将样品溶解在缓冲液中是很不明智的。重复冻融会显著降低样品的可使用性。如果必须储存重新溶解的样品，最好分装后－80℃储藏。

㉕ 如果测得的 A_{260}/A_{280} 低于 1.65，这通常表明样品有蛋白质污染，因为蛋白质的最大光吸收在 280nm。这也可能是残余的苯酚造成的，可以再用氯仿抽提一次；RNA 沉淀溶解不完全时也可能导致这种情况发生。

㉖ 从含有 DNA 的裂解液中回收 RNA 时，pH 低于 6.0 的有机溶剂抽提会驱使 DNA 停留在水相-有机相的界面。用这种方法纯化的 RNA 几乎肯定是含有基因组 DNA 的。用 DNase Ⅰ处理样品是必要的步骤，尤其是将要用作 PCR 相关操作的时候。

㉗ 和通常看法不同的是，在一个杂交盒内同时进行几张膜的杂交并没有什么不妥。只要有足够多的缓冲液能保证膜与膜不贴在一起，并且每张膜都能在杂交盒内随着摇床的节奏自如摇动（水平摇床是一个不错的选择），两张或多张膜是不会互相影响的。

㉘ 准备用 X 射线片记录放射自显影和化学发光前，先确认其线性范围。做斑点印迹时，每个样品多做几个稀释梯度，这样，解释数据时就能更精确。可以通过改变曝光时间来改善与底片曝光的线性范围，并可凸现样品之间的差别。

㉙ 为了永久记录分子量标准在 X 射线片上的位置，可以标记少量分子量标准的探针与之进行杂交。这样就不用花时间去猜测分子量标准和样品之间的相对位置。

㉚ 所有化学制品都是有潜在毒性的。个人应接受实验室技术和安全操作培训。与分子生物学相关的许多常规操作都有内在的危险性，所以要遵守试剂或设备制造商提供的安全操作、控制，以及个人安全保护建议。

㉛ 保存好危险化学试剂附带的材料安全数据表（material safety data sheet，MSDS）。让实验室所有成员熟悉这些成分的潜在危险。这些数据单上也描述了万一事故发生时如何进行恰当急救的方法。

㉜ 每次打开新包装时，要检查酶和其他反应成分。没有活性的酶只能造成一个后果：没有结果！

㉝ 为多个反应配制总反应液时，再额外多配一个反应体积。以防万一微量移液器有小

小误差，这是能确保有足够总反应液的标准做法。这种操作适用于 cDNA 总反应液（第一链和第二链）和 PCR 总反应液的配制。

㉞ 做 cDNA 和 PCR 相关实验时，要养成制备总反应液的习惯。这在做差异显示 PCR 和定量分析时显得尤为重要。即使是最细微的如微升反应体积或是纳摩尔浓度上的差别，都会对最终结果的精确度造成巨大的负面影响。

㉟ 确认酶的终浓度。分子生物学使用的酶通常储存在 60% 甘油里。一个反应所使用的酶体积应不超过总体积的 5%。超过这一比例，酶就不能发挥最佳作用。

㊱ 使用 REDTaq（Sigma）时，要确保：酶确实加入反应管中了；确认酶与反应液混合均匀了。

㊲ 使用带有热盖的 PCR 仪来优化 PCR 比较容易，因为可以用小反应体积，省略了加矿物油的步骤，可以做很多个样品。并且，许多研究者声称加了矿物油的反应体积还是会明显减少。

㊳ 不要把微量离心管储存在液氮里。

㊴ 绝对不要用嘴来使用移液管，要戴防护镜。

㊵ 在实验室要注意恰当穿戴，不穿有孔的牛仔，不披散长发，不面部穿刺，不穿拖鞋，不穿露脚趾的鞋。并且穿工作服。

（金言译；刘望夷校）

附　录

附录 1　保存完整和准确的记录

保存完整和准确的实验记录是十分必要的。

保持良好记录的技巧，比科学研究中任何其他方面对研究的影响都更加巨大。令许多研究生都大为惊讶的是，实验室里的一些结果往往得益于那些失败实验的记录，当时它们很好地记录了与研究相关的事件。准确而有价值的记录，不但是连续工作的重要组成部分，而且也是已完成工作的唯一证据，以及显示数据每一个部分产生次序的唯一场所。

对于开始研究实践的学生，他们的大学生时期比他们的研究生时期明显重要。平时，实验室研究最初可能涉及的东西，是一些令人生厌的零碎小工作，往往最先摆在学生们面前的是必须做好记录。虽然实验室高级管理者的要求当时看起来似乎没有什么意义，但是，总有一天那些看来无用的信息一定会被用到的。笔者的意见是，记录很多比让任何事情留待想象要好得多。

实验室领导者的责任是修正带进实验室的坏习惯，防止实验室新成员带进任何有关记录的坏习惯以及低劣的实验室技术。下面列出了人们在研究工作中应当遵循的规则。它不包括所有的细则，应当修正以适合委托人和实验室成员的要求。

① 实验一开始，就要记录每个正在进行实验的各个方面的情况。不要依赖记忆数据，也不要等到一天结束后才记录每一件事。

② 不要将实验过程和数据写在小纸片上。所有这类“固定”的纸片往往会放错地方或者丢失。这类数据也可能会被错放到记录本的其他部位。

③ 如果可能，实验室的记录应当保存在计算机里，而且数据应当每天输入。

④ 记录清晰是极其重要的。如果读者单靠记录本不能准确理解和重复实验过程，即使用标点符号修饰的复杂句型来记录实验过程也是无益的。

⑤ 不要担心那些没有达到或没有全部达到预期结果的实验。但是，必须把实验中每一件事都记录下来。往往可以通过详细排查失败的原因收集到有用的信息。就像生活中随处可遇到的一样，在实验室也可以从错误中学习。

⑥ 专业实验室的记录本是装订成册并且每一页都编码的。

⑦ 在记录实验程序和数据时，日期书写在每一页的上方。

⑧ 在每一个新的实验开始时写几句话，为实验提供合理的诠释和确实的参考，或者提醒要注意到对新实验有用的以前的实验或样品。

⑨ 要记录每一种新试剂、试剂盒或其他化学品的批号，这些对正在进行的研究有用。现在许多供应商都提供公司产品相关数据的说明书，这些纸片很容易粘贴在记录本的当前页

上作进一步参考用。有效期也应当记录下来。

⑩ 实验室的记录应当结合计划定期评审，检查这些记录的完整性及易理解性。如果需要，可以进一步提出如何改善记录的建议。

⑪ 如果数据用手记录在实验室记录本上，只能用黑墨水。这是行业标准。最近流行荧光笔和彩色油质墨水，它们难以阅读并且很不专业，应当避免。

⑫ 如果手写体较差，应当用印刷体书写。

⑬ 决不可以在实验室记录本上使用修正液或者橡皮抹去字句。如果需要更改，记录者应当在不正确的字句处画线并签名，简要写明变更的结果。

⑭ 决不可以从记录本上撕毁和转移记录纸。

⑮ 对于有激情的研究者而言，没有任何一条是可以替代的。

附录2　储　存　液

(1) AE 缓冲液

50mmol/L 乙酸钠

10mmol/L EDTA

调节 pH 至 5.3；高压灭菌

(2) 青霉素 (1000×)

100mg/ml 水溶液

过滤除菌 (0.22μm)；分装，保存于−20℃

(3) 变性缓冲液 (用于 DNA 印迹法)

0.5mol/L NaOH

1.5mol/L NaCl

当心　不要高压灭菌。

(4) Denhardt 溶液 (50×)

1% 牛血清白蛋白 (BSA)

1% Ficoll

1% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

过滤除菌 (0.22μm)；分装，保存于−20℃

(5) DEPC-水 (二乙基焦碳酸酯处理的水)

见“水”

(6) DNA (异源)

10mg/ml 水溶液

煮沸并用 18 号注射针头剪切

分装并保存于−20℃

使用前再煮沸

(7) Na_2-EDTA (500mmol/L) (乙二胺四乙酸二钠盐)

低于 pH7.5 时不能溶解

用 10mol/L NaOH 或者 NaOH 颗粒调节至最终 pH 为 8.0

高压灭菌；保存于室温

(8) 溴化乙锭

10mg/ml 溶于无菌水中

当心 强致癌物。

用铝箔包裹保存于 4℃

(9) GTC (亦称为溶液 D) (硫氰酸胍)

4mol/L 硫氰酸胍

5mmol/L 柠檬酸钠，pH 7.0

0.5% *N*-十二烷基肌氨酸钠

分装，置于铝箔包裹的瓶中，4℃保存

使用前加入 100mmol/L β-ME

当心 是极强的破膜试剂。

(10) 杂交缓冲液

根据需要有多种不同配方

详情参见第 14 章

(11) LB (Lauria-Bertani) 培养基

每升：10g 胰蛋白胨

5g 酵母抽提物

10g 氯化钠

用 1mol/L NaCl 调节 pH 至 7.4

高压灭菌；用无菌技术分装

(12) 上样缓冲液 (10×)

50%甘油

10mmol/L EDTA，pH8.0

0.25% 溴酚蓝

有许多不同的配方

分装，每个包装 1ml，保存于−20℃

(13) MOPS[3-(*N*-吗啉代)-丙磺酸]缓冲液 (10×)

200mmol/L MOPS，pH7.0

50mmol/L 乙酸钠

10mmol/L Na_2-EDTA，pH8.0

过滤除菌或者高压灭菌；室温保存

(14) NaCl (饱和) (氯化钠)

用足量的 NaCl 制成 6mol/L 的水溶液

需要时高压灭菌

(15) NaOH (10mol/L)

将 40g NaOH 颗粒加入 60ml 水中

加水至 100ml

当心 产热剧烈；即使冷却后也不要高压灭菌；是腐蚀性极强的碱。

(16) 中和缓冲液 (用于 DNA 印迹法)

0.5mol/L Tris，pH8.0

1.5mol/L NaCl

需要时高压灭菌或者过滤除菌

(17) NP-40 裂解缓冲液

140mmol/L NaCl

1.5mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L Tris，pH 8.5

0.5% NP-40

可选择：在使用前加 RNase 抑制剂

(18) PBS（phosphate buffered saline，磷酸盐缓冲生理盐水，无 Ca^{2+}/Mg^{2+}）

每升：8g NaCl

0.2g KCl

1.44g Na_2HPO_4

0.24g KH_2PO_4

分装并高压灭菌

(19) 苯酚（饱和）

说明和方案见附录 3

(20) 磷酸盐缓冲液（10mmol/L，$Na_xH_xPO_4$，pH7.0）（电泳缓冲液）

每升：39ml 1mol/L NaH_2PO_4

61ml 1mol/L Na_2HPO_4

检查 pH

调节体积至 1L

分装并高压灭菌

(21) SDS（10%）（十二烷基硫酸钠）

将 10g SDS 加入 80ml 无菌水中

当心　不要吸入 SDS 粉末。

加水至 100ml

室温保存

不要高压灭菌

(22) SSC（20×）（saline sodium citrate，柠檬酸钠生理盐水）

3mol/L NaCl

0.3mol/L 柠檬酸钠

用 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.0

高压灭菌；室温保存

(23) SSPE（20×）（saline sodium phosphate-EDTA，磷酸钠-EDTA 生理盐水）

3mol/L NaCl

0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

0.02mol/L Na_2-EDTA

调节 pH 至 7.4

高压灭菌；室温保存

(24) TAE（50×）（Tris-乙酸盐-EDTA）

每升：242g Tris 碱
100ml 0.5mol/L Na_2-EDTA，pH8.0
57.1ml 冰乙酸（小心操作）
高压灭菌；工作浓度为 1×TAE
(25) TBE（20×）（Tris-硼酸盐-EDTA）
每升：121g Tris 碱
61.7g 硼酸钠
7.44g Na_2-EDTA
高压灭菌；工作浓度为 1×TBE
(26) TE 缓冲液（商用）
10mmol/L Tris，pH7.5
1mmol/L EDTA
高压灭菌；室温保存
调节 pH 至 8.0 用于 DNA 保存
(27) TE 缓冲液（改良）
10mmol/L Tris，pH7.5
0.1mmol/L EDTA
高压灭菌；室温保存
调节 pH 至 8.0 用于 DNA 保存
(28) TE-9 缓冲液
500mmol/L Tris，pH9.0
20mmol/L EDTA
10mmol/L NaCl
高压灭菌；室温保存
(29) 四环素（1000×）
溶于 70%乙醇，12.5mg/ml
过滤除菌（0.22μm）
分装，保存于－20℃
(30) Tris（1mol/L）
称出足量的 Tris 用于制备 1mol/L 储备液，用 2/3 左右体积的水溶解
调节至要求的 pH，加水至终体积

注意 Tris 碱和 Tris-Cl 的 pH 调节不同。

需要时高压灭菌
(31) Tris/SDS 缓冲液
100mmol/L NaCl
1mmol/L EDTA
10mmol/L Tris，pH8.5
高压灭菌；然后加 0.5% SDS
保存于室温
(32) 水（DEPC 处理；无 RNase）

实验室级别的水（去离子/蒸馏）中加入 DEPC 至终浓度为 0.05%～0.1%（体积分数），在定轨摇床振摇数小时或者在磁力搅拌器上快速搅拌 30min 以上，高压灭菌以破坏 DEPC。

当心　DEPC 是致癌物质。注意厂家推荐的安全说明。不要把 DEPC 加到任何含氨基的溶液中。详情见第 4 章。

(33) YPD 培养基（酵母培养基）

每升：10g 酵母抽提物
　　20g 蛋白胨
　　20g 葡萄糖

分装并高压灭菌

附录 3　苯酚的制备

当心　苯酚和氯仿都是挥发性的、腐蚀性的试剂。在处理使用这类有机溶剂时必须注意安全，要使用一次性手套、防护眼镜以及通风橱。

苯酚在所有分子生物学应用前都必须纯化或重蒸。很容易从所有主要的分子生物学试剂供货商那里以非常合理的价格购得重蒸苯酚。在实验室里重蒸苯酚是一个非常危险的程序，应当由有经验的实验人员来完成。即使那样，这将是非常使人气馁的工作。有关实验室中蒸馏苯酚的详情可以在别处找到（Wallace，1987）。

在本实验室，标准程序是购买分子级（即重蒸的）的苯酚，分装成合适大小的包装，用铝箔包裹，冷冻保存；每一份苯酚必须直到首次使用前再进行饱和。

苯酚光敏性很强并且能迅速氧化。氧化产物称苯醌。它形成游离基，能打断磷酸二酯键并和核酸交联。苯醌通常可以使酚试剂产生浅桃红色，可根据颜色来检查它的存在。为了降低苯酚氧化的速率，可以在缓冲液饱和的苯酚中加入 8-羟基喹啉（见第 5 章）。此外，在有机抽提缓冲液的制备中加入等体积的氯仿，可以稳定苯酚，加大混合物密度，改善从样品中去除蛋白质的有效性，并且可以在 RNA 制备中促进脂肪的去除。往往会在氯仿或苯酚-氯仿混合物中添加异戊醇，异戊醇通常可以减少在大多数抽提过程中伴随产生的蛋白质泡沫。按此方法制备的饱和苯酚试剂称为抽提缓冲液。通常，有机抽提缓冲液的组成是苯酚∶氯仿∶异戊醇（25∶24∶1）。

举例：购买的重蒸苯酚通常是 500g/瓶。实验室收到苯酚后，在通风橱内 65℃水浴融化。然后用消毒的玻璃移液管把最多 25ml 的苯酚转移到 50ml 圆锥形的聚丙烯管（决不能是聚苯乙烯）中或者 100ml 玻璃瓶（最多加入 50ml 苯酚）中。然后，分成若干份，密封，用铝箔包裹，保存于－20℃。这样可避免不用的苯酚被反复冻融。制备使用的苯酚试剂时，取一份苯酚一次融化，然后可按这里描述的方法或者按规范的制备程序饱和苯酚。如果要制备 50ml 抽提缓冲液，那么取 12.5ml 融化的苯酚放入 50ml 的管中，进一步操作并冷冻保存。

为了制备抽提缓冲液，融化苯酚，加入等体积的 Tris 缓冲液（见后述）饱和，管中的体积大约是 25ml。通常接下来加入等体积（25ml）氯仿∶异戊醇（24∶1）混合物。这样将得到 50ml 饱和的抽提缓冲液，它适合于许多应用。这时，可加入 8-羟基喹啉，终浓度为 0.1%（1g/L）；抽提缓冲液就这样可以使用了。这个基本策略可以用于任何体积抽提缓冲液的制备。为了方便起见，可以从 Sigma 公司购买到饱和苯酚和现成的抽提缓冲液（货号分别是 Cat. Nos. P-4557 和 P-3803）。

3.1 苯酚的饱和

苯酚的饱和有两种标准方法，每一种方法的标题下又有若干种改良的方法。这些方法中的一种是 Tris 饱和，实验室里用它来制备并保持已知 pH 的饱和苯酚储备液，或者将它用于某个特定的方案，在使用前制备一种具有特定 pH 的含苯酚的抽提缓冲液。这里特别要注意到，苯酚氧化的速率随着 pH 的增高而增高。所以，pH 大于 8.0 的苯酚缓冲液应当在每次使用前新鲜制备。酸性 pH 平衡的饱和苯酚缓冲液，如果用铝箔包裹并 4℃保存，可以认为 4～5 周内是稳定的。另一种方法是水饱和，它用于对苯酚的起始 pH 要求不严格的场合。一般情况下苯酚决不能用水饱和，除非是特定方案的特殊需要。用水饱和时，通常将苯酚与一定体积的适当的缓冲液（例如乙酸钠，pH 4.5；Chomczynski 和 Sacchi，1987；见第 5 章）混合达到有机相的最终 pH 值。明智的做法是仅仅制备特定实验需要量的抽提缓冲液；剩余的缓冲液，按照实验室关于有机垃圾的处置办法处理。

饱和苯酚的 pH 选择主要取决于分离的是 DNA 还是 RNA。极其重要的原则是，在苯酚裂解物中，核酸在水相和有机相中的分配完全是 pH 依赖的。在酸性 pH 时，只有 RNA 保留在水相；而在碱性 pH 时，RNA 和 DNA 两者都保留在水相（Brawerman 等，1972）。如 pH 小于 5.5 时，DNA 选择性地保留在有机相和界面，而 RNA 可以从水相有效回收。这种方法的一个关键性的优点是，酸性 pH 时核酸酶的活性下降。另外，如果 DNA 是抽提的靶分子，则将抽提缓冲液的 pH 调节到 7.5 以上，这是工业标准。此外，接近中性 pH 平衡，可以非常有效地、安全地防止样品的过度脱嘌呤作用。

有机溶剂平衡到合适的 pH，也直接与苯酚是单独使用还是与氯仿和/或异戊醇结合有关。例如，用酸性 pH 的苯酚抽提裂解液，会引起 RNA（和 DNA，如果存在）脱嘌呤，还有 poly(A)$^+$ mRNA 可能会损失在有机相。在裂解缓冲液和/或抽提缓冲液中分别加入 SDS 或氯仿，或者两者同时加入，即可以避免这种现象发生。

3.2 程序 1：Tris 饱和

当心 全过程必须戴手套和防护眼镜。

① 在 65℃水浴中完全融化适量的重蒸苯酚。

② 加入等体积的 1mol/L Tris，pH 8.0（或者按照实际要求的 pH）。另一种可选择的方法是，苯酚用 TE 缓冲液（10mmol/L Tris，pH 8.0；1mmol/L EDTA）或者 Tris-SDS 缓冲液（100mmol/L NaCl；1mmol/L EDTA；10mmol/L Tris-Cl，pH 8.5；0.5% SDS）平衡。无论如何，都是用等体积的缓冲液饱和。

③ 小心混合，让两相完全分离。可以用台式离心机简单离心以加速两相的分离。

④ 观察底层的酚相确认它是无色的。任何着色的苯酚，特别是略带桃红色的，是因为有苯醌存在而应当丢弃。酚相的体积应当大于上层水相，因为水相中的某些成分优先吸收到酚相中了。

⑤ 移出并弃去上层水相，保留酚相，加入等体积的 100mmol/L Tris 或者其他 Tris 缓冲液，调节 pH 与步骤②中的相同。

⑥ 小心混合，让两相完全分离。可以用台式离心机简单离心以加速两相的分离。

⑦ 移出大部分上层水相并测量它的 pH。如果水溶液的 pH 大于 7.5，认为苯酚已经 Tris 饱和，可以使用了。如果 pH 小于 7.5，重复步骤⑤和步骤⑥。

⑧ 饱和苯酚用铝箔包裹保存于4℃。如果需要，可以与等体积的氯仿：异戊醇（24：1）和0.1%（1g/L）8-羟基喹啉混合。

3.3 程序2：水饱和

当心 全过程必须戴手套和防护眼镜。

① 在65℃水浴中完全融化适量的重蒸苯酚。

② 加入等体积的消毒蒸馏水。

③ 在使用前让两相完全分离。可以用台式离心机简单离心，以加速两相的分离。

④ 弃去上层水相或者与苯酚一起保留在管中以作为饱和的证据。

⑤ 饱和苯酚用铝箔包裹保存于4℃。如果需要，可以与等体积的氯仿：异戊醇（24：1）和0.1%（1g/L）8-羟基喹啉混合。

3.4 参考文献

Brawerman, G., Mendecki, J., and Lee, S. Y. (1972). A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **11,** 637.

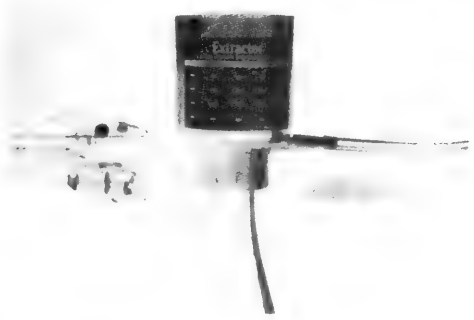
Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162,** 156.

Wallace, D. M. (1987). Large- and small-scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* **152,** 33.

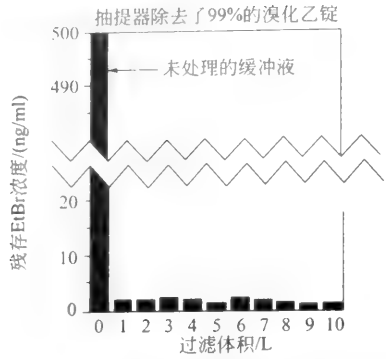
附录4　溴化乙锭和SYBR绿溶液的处置

常用于凝胶中核酸染色的溴化乙锭（EtBr）、SYBR绿和类似的染料都是极强的诱变剂（MacGregor和Johnson，1977）。作为插入试剂和与核酸结合的染料，它们应当作为毒性废弃物来处置；适当的处理涉及防止环境污染。只有在适当的处理后，沾染溴化乙锭和SYBR绿的污物才能放心地装罐处置。

很多常见的出版物都详细描述了溴化乙锭废弃物的处理方法（Lunn和Sansone，1987，1990；Bensaude，1988）。现在已不推荐在溴化乙锭废弃物中加漂白粉的曾广泛使用的处理方法，因为这种方法虽然降低了溴化乙锭的诱变性，但将这种染料转变成了另一种诱变剂（Quillardet和Hofnung，1988）。作为替代方法，必须接受下述任何一种方案作为实验室处理溴化乙锭以及SYBR绿的标准方案。它们处理的工作浓度为：溴化乙锭0.5～1.0μg/ml、



附图4-1　从电泳和染色缓冲液中除去溴化乙锭和SYBR绿的抽提器过滤装置。照片由Schleicher & Schuell Bioscience公司提供



附图 4-2　含 500ng/ml 溴化乙锭缓冲液成功滤过抽提器的体积（L）。滤液中残存溴化乙锭的浓度用荧光分光光度计测定。数据由 Schleicher & Schuell Bioscience 公司提供

SYBR 绿 1×～4×。超过此浓度的染料，可以稀释后用下述方案处理。

4.1　方案 1

该方案是用抽提器（Schleicher 和 Schuell；Cat. No. 448031）处理染凝胶废液，一步除去溴化乙锭和 SYBR 绿的方案（附图 4-1）。该装置一次可以过滤 10L 含溴化乙锭的电泳缓冲液，去除率大于 99%（附图 4-2）。抽提器内充填活性炭，可根据厂家的说明使用。过滤后的废液可以安全地排入下水道。这是一种处理此类废弃物的昂贵而有效的方法，在分子生物学实验室中使用很广泛。

4.2　辅助方案

过滤后废液中残存溴化乙锭的定量检测步骤（Menozzi 等，1990）如下。

① 用工作缓冲液或染色缓冲液配制 100μg/ml 的鲑精 DNA 溶液。配制用于作标准曲线的0～500ng/ml 浓度范围的溴化乙锭稀释液。

② 在 1ml 一份的过滤后废液中加入鲑精 DNA，使其最终浓度达 100μg/ml。

③ 用荧光计测定标准溶液和未知溶液的荧光读数（激发波长为 526nm，发射波长为 585mm）。绘制标准曲线，从标准曲线上读出未知溶液的溴化乙锭浓度。当溴化乙锭浓度低至 4 ng/ml 时，该测定通常也是线性的（$r=0.999$）。

4.3　方案 2

含工作浓度的溴化乙锭、SYBR 绿和其他相关染料的溶液中，每 100ml 溶液加 3g Amberlite[1] XAD-16（Sigma Cat. No. XAD-16），可以去污染（Joshua，1986；Lunn 和 Sansone，1987）。这种树脂是一种非离子型聚合物吸收剂。溶液室温下间歇振摇 12～16h，然后用 Whatman 1 号或相当型号的滤纸过滤。包括树脂在内的固体过滤废弃物均需作为有毒物处理，并按实验室内部规定处置。过滤后的溶液可以排放。

4.4　方案 3

每 100ml 含工作浓度的溴化乙锭、SYBR 绿的溶液中，加入 100 mg 活性炭（Sigma

[1] Amberlite 树脂由 Rohm and Hass, Inc.（Philadelphia，PA）生产。

Cat. No. C-2889）（Bensaude，1988）。混合物在室温下间歇振摇 1h，然后用 Whatman 1 号或相当型号的滤纸过滤。包括活性炭在内的固体过滤废弃物均需作为有毒物处理，并按实验室内部规定（policy）处置。过滤后的溶液可以排放。

4.5　参考文献

Bensaude, O. (1988). Ethidium bromide and safety—readers suggest alternative solutions. [Letter]. *Trends Genet.* **4,** 89.

Joshua, H. (1986). Quantitative absorption of ethidium bromide solutions from aqueous solutions by macroreticular resins. *BioTechniques* **4,** 207.

Lunn, G., and Sansone, E. B. (1987). Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions. *Anal. Biochem.* **162,** 453.

Lunn, G., and Sansone, E, B. (1990). Degradation of ethidium bromide in alcohols. *BioTechniques* **8,** 372.

MacGregor, J. T., and Johnson, I. J. (1977). In vitro metabolic activation of ethidium bromide and other phenanthridium compounds: mutagenic activity in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* **48,** 103.

Menozzi, F. D., Michel, A., Pora, H., and Miller, A. O. A. (1990). Absorption method for rapid decontamination of solutions of ethidium bromide and propidium iodide. *Chromatographia* **29,** 167.

Quillardet, P., and Hofnung, M. (1988). Ethidium bromide and safety—readers suggest alternative solutions. *Trends Genet.* **4,** 89.

附录 5　用 DNase Ⅰ去除 RNA 样品中的 DNA

在不少场合，往往必须纯化污染有 DNA 的 RNA 样品，特别是在为 PCR 应用而制备 RNA 时。虽然过去已经用等密度离心法来粗略地分离污染的样品，但是这种方法耗时，需要昂贵的高度专一的设备，产率不高，而且当样品中 DNA 和 RNA 的总量不到毫克级时，它不是一种很好的方法。此外，用一种很古老的 pH 技巧来分离 RNA 和 DNA 的大众化的酸性苯酚法，虽然它很有效，但是还不足以确保水相中只有 RNA（第 5 章），而且在微量移液管密切接近有机相时极有可能带出 DNA。这就会给以 RNA 为基础的实验在定量方面带来明显的影响。在 RNA 和 DNA 两者共存时，探针和引物往往很难区分 RNA 靶目标和 DNA 靶目标。在这些场合下，用去核酸酶的脱氧核糖核酸酶Ⅰ（RNase-free DNase Ⅰ）简单地温育就可以借着核酸酶的消化作用消除 DNA，然后 RNA 溶液可以直接使用；也可以用苯酚：氯仿抽提和/或用标准的盐加乙醇沉淀浓缩（第 5 章），或者用其他方法纯化。DNase Ⅰ处理的方法不仅限于制备无 DNA 污染的 RNA，还包括在体外转录反应、DNA 探针的缺口平移，以及用 DNase Ⅰ足迹方法研究 DNA-蛋白质相互作用等场合中用来降解 DNA 模板分子。

商品化的无 RNase 的 DNase Ⅰ制剂，例如 RQ 1（Promega），都是用很多方法中的任何一种进行标准的纯化，除去所有可检出的痕量 RNase，并且制造商保证产品不含有内在的 RNase 活性。这些制备方法在实验室是非常方便的，也优于购买的费用。但是因为 DNase Ⅰ的不稳定性，在实验室制备无 RNase 的 DNase Ⅰ也没有简单易行有效的方法。

5.1　实验方案

① 在怀疑污染有 DNA 的 RNA 样品中加入无 RNase 的 DNase Ⅰ，直至终浓度约为 1U/μg 核酸。

注意 1 DNase Ⅰ在由 40mmol/L Tris-Cl（pH 7.9）、1mmol/L $CaCl_2$ 和 5mmol/L $MgSO_4$ 组成的工作缓冲液中表现出最佳活性。这种缓冲液或类似的配制液通常以 10× 反应缓冲液的稀释液与购买的酶一起提供。

注意 2 无 RNase 的 DNase Ⅰ的活性通常以单位（units）表述，这里 1U DNase Ⅰ可以在 37℃ 10min 降解 1μg DNA，反应体积通常为 20～50μl。记住在含有 EDTA、SDS 以及其他变性剂的缓冲液中，或者加热超过 37℃，DNase Ⅰ可以强烈被抑制。

② 混合物 37℃保温 15～30min。如果需要，保温 1h 也是可以的。

③ 样品加热到 65℃保温 10min 终止反应。另一种方法是加入 EDTA 至终浓度为 2mmol/L，也能终止 DNase Ⅰ的酶活性。

注意 在反转录 PCR（RT PCR）中不推荐用 EDTA 终止反应。通常会与这种酶一起提供一种停止反应的缓冲液（EGTA）。

④ 在变性条件下电泳一份样品，估量样品中 DNA 消化的程度和 RNA 的完整性。

⑤ 此时 RNA 可以直接用于 RT-PCR。

附录 6 用 RNase 去除 DNA 样品中的 RNA

在某些场合，例如分离高分子量的基因组 DNA（附录 11）时，实验设计可能需要在不损伤 DNA 完整性的前提下去除所有污染的 RNA。这些场合中，在 RNase 储备液使用前，必须清除储备液中所有内在的 DNase 活性。如附录 5 中指出的那样，可以用等密度离心法简单分离污染的样品，但是这种方法耗时，需要昂贵的高度专一的设备，而且对于总量低于毫克级的 DNA 和 RNA 样品，它不是一种很好的方法。此时，用无 DNase 的 RNase 简单温育就可以完成此任务。经制造商鉴定，商品去 DNase 的 RNase 不含内在的 DNase 活性。RNase 的粗制品如果不进行专门处理，也可能含有一定量的 DNase（Gillespie 和 Spiegelman，1965）。

与从 DNase 中清除 RNase 活性不同，在大多数分子生物学实验室里都能制备去 DNase 的 RNase。最大众化的 RNase 是 RNase A 和 RNase T_1。下列程序仅仅是自制版本的制备法。商品 RNase 是可以直接使用的。

6.1 实验方案：从 RNase 中清除 DNase 活性

① 用无菌水或 TE 缓冲液（10mmol/L Tris-Cl；1mmol/L EDTA，pH8.0）配制 RNase A、RNase T_1，或者两者混合的 10mg/ml 的储备液。

② 加热 RNase 储备液至接近沸点（90℃）10min。冰浴冷却并分装冻存。

注意 虽然有些 RNase 制剂在煮沸处理后仍可保存显著的 RNase 活性，但不鼓励在这个特殊情况下使用该方法；90℃时 DNase 活性将迅速清除而对试剂中的 RNase 活性没有损害。

6.2 实验方案：RNA 的消化

① 将无 DNase 的 RNase 加入样品中至终浓度为 10μg/ml。

② 37℃保温 10～30min。

③ 用等体积的苯酚：氯仿（1∶1）或苯酚：氯仿：异丙醇（25∶24∶1）抽提终止 RNase 的消化作用。

④ 用盐和乙醇沉淀浓缩 DNA，或者直接用于限制性内切酶的消化反应、PCR 等。

⑤ 将基因组 DNA 置 4℃保存，质粒 DNA 可以在－20℃长期保存。

6.3 参考文献

Gillespie, D., and Spiegelman, S. (1965). A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**, 829.

附录 7　甲酰胺、甲醛和乙二醛的去离子化

许多分子生物学实验室都常规使用甲酰胺、甲醛和乙二醛。这些试剂能迅速氧化，因此在用于杂交和核酸变性时，为了达到最佳效果，使用前必须去离子化。这里介绍两个常用的去离子化方法。

常用的分子生物学试剂的去离子化，只要在试剂中加入少量混合床树脂（Sigma；Catalog No. M-8032）就可以做到。这种混合的阴离子和阳离子交换树脂是强酸性和强碱性的，可促使去离子化加速进行。50ml 欲去离子化的试剂中加入 5g 混合床树脂，旋转混合 2～3min。当树脂的容量达到时，它的颜色就会从蓝色变成金色。去离子化应当在 30min 内完成，而且也可能需要多加一份的树脂。用过滤或离心来去除树脂。去离子的乙二醛分成若干份，密封保存于－20℃；去离子的甲酰胺和甲醛应当在去离子化后尽快使用。每份去离子试剂一经打开，用后应当丢弃，不得再用。

另一种可选择的方法是，甲酰胺、甲醛和乙二醛液也可以用 AG 501-X8 混合床树脂（Bio-Rad）。AG 501-X8 树脂是 1∶1 的 AG 1-X8 树脂（OH^-）和 AG 50W-X8 树脂（H^+）的混合物。推荐每 1g 欲去离子化的试剂加入 AG 501-X8 树脂 1g。去离子化需要 1h 左右，混合物可以保留过夜。然后过滤去除树脂，去离子的试剂如上所述保存备用。Bio-Rad 的 AG 501-X8 树脂不管有没有连接染料都是有效的，在去离子化过程进行时它会显示颜色变化。

附录 8　硅烷化离心管和玻璃器皿

由于核酸固有的黏性，为了得到最大的样品回收率，经常需要硅烷化玻璃器皿（和在有些场合用的聚丙烯管）。例如，硅烷化 Corex 或 Pyrex 玻璃试管和微量离心管，可以在大规模分离核酸以及 cDNA 的许多下游操作中，使 RNA 的损失降到最小，但不可避免 RNA 总会有一些损失。在处理小量样品时硅烷化特别有用。

8.1 实验方案

Sigmacote（Sigma；Cat. No. SL-2）是一种非常有用的硅烷化试剂，它能迅速硅烷化玻璃器皿和一定类型的塑料器皿。Sigmacote 是一种特殊的硅酮己烷溶液，在它接触的表面可以形成一层紧密的、极薄的疏水薄膜。

① 保证按照制造商的关于 Sigmacote 安全使用说明操作。

② 用 Sigmacote 注满覆盖管子，但要避免浸染外面，因为如果管子外面硅烷化了，试管将变得非常光滑，在它上面很难书写。

③ 排尽 Sigmacote 并让管子空气干燥，一般需要 5～10min 完成。干燥的表面基本上是中性的。

注意　避湿条件下，Sigmacote 可以重复使用。

附录 9　分子生物学家的主流工具——离心法

离心法是一种分离技术，它所依据的是这样的事实　　做圆周运动的物体受一种方向向

外的离心力的支配。这种力的大小通常用地球重力的术语表示［相关的离心力（RCF）或者 g 的倍数］，它是旋转半径和角速度的直接函数。离心法是一种不可缺少的分离方法，它根据物体的大小和密度从溶液中分离细胞、细胞器和大分子（也包括质粒等）。因此，这类设备在许多实验室里一直在使用。然而，不恰当的操作和保养，可以引起永久性损害或者更糟糕的后果。特别在使用超速离心机时，使用者的责任是，保证离心机和离心转头一定要在机器设计的范围内操作。这也包括转头的减速，要按照购买时附有的手册上叙述的方法进行操作。

9.1 离心机的类型

（1）台式临床用离心机

- 一般在室温下操作，转速在 3000r/min 以下。

（2）高速离心机

- 通常在冷冻情况下操作，转速在 20000～25000r/min 之间。

（3）台式微量离心机（Microfuges）

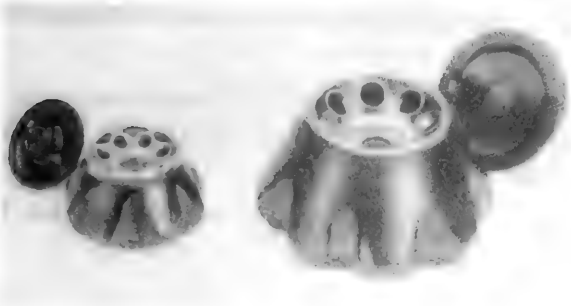
- 转速至 14000r/min（12000×g）。
- 有些时候提供冷冻。
- 对小体积的核酸样品是不可缺少的。

（4）超速离心机

- 转速至 500000×g（75000r/min，r=8cm）。
- 可以细分亚细胞器。
- 可以严格地按照密度细分不同的分子。
- 有很宽的有效温度范围。
- 真空操作。

9.2 转头

离心机的设计，专门满足了分离要求的特殊需要。离心参数包括温度、RCF、样品体积、运作持续时间、梯度状态（例如线性或者分阶段）、选择差式还是密度梯度分离、转头的类型。固定角度转头（附图 9-1），它让放在里面的样品在离心期间保持固定角度。相反，翻转式（swinging-bucket）转头（附图 9-2），它让放有样品的离心管架或桶向外摆动到与旋



附图 9-1 固定角度转头。样品在离心期间保持固定的角度。由 Sorvall 公司提供

附图 9-2 翻转式转头。持有样品的离心管架向外摆动到与旋转轴线成 90° 的位置。由 Sorvall 公司提供

转轴线成90°的位置。垂直转头在整个离心过程中都保持样品管直立，平行于旋转轴线。选择固定角度转头、翻转式转头还是垂直转头，完全取决于设计方案。固定角度转头适用于各种不同的离心技术，而翻转式转头和垂直转头则对梯度分离有效。

比较各种转头性能的有用方法，是比较它们各自的 k 因子或 k' 因子。实际应用中这个数值用来比较转头之间的效率。在颗粒的沉降系数已知时，k 因子可估计沉淀所需时间，k' 因子表明了把颗粒带移动到离心管的底部需要的时间。简而言之，k 因子越低转头的效率越高。附表 9-1 和附表 9-2 中提供了几种常用转头的特征。

附表 9-1　Sorvall 公司制备型翻转式超速离心转头的技术规格

转　头	最高速度 /r·min^{-1}	最大 RCF/×g	k 因子	管数×额定体积	额定转头容量 /ml	转头半径(r_{max}) /mm
RP55-S	55000	258826	43.7	4×2.2	8.8	76.6
S55-S	55000	258826	43.7	4×2.2	8.8	76.6
TH-660	60000	488576	44.4	6×4.4	26.4	121.5
AH-650	50000	296005	53.0	6×5.0	30	106.0
TH-641	41000	287660	114.0	6×13.2	79.2	153.2
SureSpin 630(17ml)	30000	166880	255	6×17	102	166.0
SureSpin 630(36ml)	30000	166880	216	6×36	216	166.0
AH-629(17ml)	29000	155846	284.0	6×17	107	165.0
AH-629(20ml)	29000	121464	176.0	6×20	120	129.3
AH-629(36ml)	29000	151243	242.0	6×36	216	161.0

注：Kendro Laboratory Products (www.sorvall.com)提供的数据。RCF，相关的离心力。

附表 9-2　Beckman 公司制备型翻转式超速离心转头的技术规格

转　头	最高速度 /r·min^{-1}	最大 RCF /×g	k 因子	管数×额定体积	额定转头容量 /ml	转头半径(r_{max}) /mm	转头半径(r_{max}) /mm
SW 65Ti	65000	421000	46	3×5.0	15	41.2	89.0
SW 60Ti	60000	485000	45	6×4.0	24.0	63.1	120.3
SW 55Ti	55000	368000	48	6×5.0	30	61.0	109.0
SW 50.1	50000	30000	59	6×5.0	30	59.7	107.3
SW 41Ti	41000	288000	124	6×13.2	79.2	67.0	152.0
SW 40Ti	40000	285000	137	6×14	84	66.7	158.8
SW 30.1	30000	124000	138	6×8	48	75.3	123.0
SW 30	30000	124000	138	6×20	120	75.3	123.0
SW 28.1	28000	150000	276	6×17	102	72.9	171.3
SW 28	28000	141000	245	6×39.0	234	75.3	161.0
SW 25.2	25000	107000	335	3×60	180	66.7	152.3
SW 25.1	25000	90400	338	3×34	102	56.2	129.2

注：Beckman Coulter Co. (www.beckman.com)提供的数据。RCF—相关的离心力。

9.3　应用[1]

在分子生物学实验室，分离 RNA 过程中有几个步骤要用到离心分离技术，包括细胞裂解获得完整细胞的沉淀，在核酸抽提过程中使两相分离，在等密度分离期间形成梯度，以及盐与乙醇沉淀浓缩核酸。

[1] 部分来自于 Griffith (1986)。

9.4 差式离心

差式离心是分离样品最简单、最直接的离心技术。在这种方法中，含均一样品混合物的离心管进行简单的离心（一般不到 30min）。运作结束时，管底的沉淀含有离心期间的全部沉淀物质。应当清楚，沉淀可能污染有开始就在管底或接近管底的物质。含有非沉淀物质的上清液一般被倒去；在沉淀非常坚实的情况下，可以用吸气装置仔细地除去。必须进一步分离时，将上清液装入新的离心管中离心。与第一次的离心相比，第二次离心需要更长的时间或更高的速度，结果产生新的沉淀和上清液。

9.5 密度梯度离心-沉降速度

一种比较复杂的制备技术是密度梯度离心，样品颗粒通过一个密度梯度而达到分离目的。梯度的密度是，最小的在管子的顶部，密度向管底逐步增加。一种密度梯度离心，即熟知的沉降速度离心或速率区带离心，样品被铺在梯度的顶部。在离心力的作用下，样品中的颗粒开始通过不连续的梯度区带向下移动；区带的移动速度受区带中各颗粒的沉降速度支配。这类分离的特征是，与浮力密度离心相比，离心梯度相对平缓、速度低、时间短。成功的沉降速度离心需要下列条件。

① 样品颗粒的密度必须比全部梯度中各点的密度都大。

② 在任何被分离物质（特别是密度最大的区带）到达管底之前，必须终止离心。

举例：一种不均一的 RNA 样品可以通过蔗糖梯度离心分出大小组分（Benecke 等，1978；Nevins 和 Darnell，1978）。典型的蔗糖梯度，平缓的在 5%～20%，陡峭的在 5%～40%；在 5%～40%梯度黏度较高的场合，可以提高离心速度来改善分辨率。按照这里定义的参数，RNA 分子可以根据它们的沉降速度移动通过梯度。离心结束时，RNA 根据分子大小，分布在整个梯度中。作为一种富集方法，从梯度中分出的各个 RNA 组分作进一步鉴定。

9.6 密度梯度离心-等密度技术

另一种密度梯度分离类型，称为等密度、浮力密度或密度平衡离心。其中，样品颗粒通过梯度移动到达与颗粒密度相等的梯度密度处，而且相同密度的颗粒悬浮在那里形成条带。与沉降速度离心不同，延长离心时间不会导致样品继续通过梯度向下迁移。梯度必须非常陡峭，最重要的是它必须超过目的颗粒的密度。注意样品中非常紧密的组分可能形成沉淀，而其他组分则仅仅迁移到与它们等密度的位置。通常用于这类分离的物质包括 CsCl、Cs_2SO_4 和 CsTFA。历史上曾用于经典的半保守复制研究的氯化铯（Meselson 等，1957；Meselson 和 Stahl，1958），通常被用于构建密度范围直到 1.8g/cm^3 的梯度。Cs_2SO_4 和 CsTFA 可以用来形成比 CsCl 梯度更陡峭的梯度，两者的梯度可相差 1 倍；前者更适宜用来分离各种不同浮力密度的 DNA。

浮力密度的梯度不需要制作。例如，在一些应用中，CsCl 被直接加到核酸混合物中（染色体 DNA、RNA、蛋白质、质粒 DNA）。因为铯盐固有的密度原因，超速离心期间，在离心力作用下，造成梯度物质的重新分布。在超速离心的速度下，大分子形成等密度条带之前，这种自身形成的梯度一般需要几个小时。但是，用微量超速离心机可以明显缩短离心时间。在运转期间产生的线性梯度中，样品的组分根据它们的密度或者沉降或者悬浮在它们的等密度区域。

9.7 参考文献

Benecke, B. J., Ben-Ze'ev, A., and Penman, S. (1978). The control of mRNA production, translation, and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* **14,** 931.

Griffith, O. M. (1986). "Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation." Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA.

Meselson, M., and Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44,** 671.

Meselson, M., Stahl, F. W., and Vinograd, J. (1957). Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **43,** 581.

Nevins, J. R., and Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: Poly (A)$^+$ nuclear sequences are conserved and poly(A)$^+$ addition precedes splicing. *Cell* **15,** 1477.

附录 10　胰蛋白酶消化贴壁细胞的方法

从生物材料中制备核酸，始于细胞裂解或组织破碎。前一种情况下，可以直接把裂解缓冲液加到含有生长细胞的培养瓶或培养皿中。然而，这种方法往往需要大体积的裂解缓冲液，这对在分离管中从组织培养物中收集和裂解细胞来说体积过大了。在悬浮培养时，可以简单地离心培养液收集细胞。对贴壁细胞，在制备 RNA 或者 DNA 分离时本实验室常规使用下列方法。

10.1 实验方案

① 从组织培养器皿中轻轻倒出生长培养液并保存。通常可以很方便地直接倒进一个 15ml 或 50ml 圆锥形管子里。

② 用 1×磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）、无钙镁的缓冲液（CMF-PBS）洗细胞单层 2 次。倒掉 PBS。

注意　1×PBS(每升)=8g NaCl，0.2g KCl，1.15g Na_2HPO_4 和 0.2g KH_2PO_4。如果需要，可以制成 PBS 的浓储备液，使用前用无菌水稀释。

③ 在每个 T-75 组织培养瓶中加入 2ml 1×胰蛋白酶-EDTA。轻缓摇动 30～60s。抽提时间取决于细胞的类型、混合程度和胰蛋白酶的温度。在细胞开始分离前必须去除组织培养瓶中的胰蛋白酶。

注意　10×胰蛋白酶-EDTA=0.5%胰蛋白酶，0.2%EDTA，通常是购买的。用 1×PBS 稀释 10×胰蛋白酶-EDTA 储备液。或者，可以购买 1× 胰蛋白酶-EDTA 直接使用。

④ 倒去胰蛋白酶。观察细胞形态变圆的情况（圆化）。

注意　在没有组织培养显微镜时，拿着培养瓶到窗口或者对着实验室的光源也可以估计细胞的圆化。因为细胞一变圆折射率❶就会发生变化，瓶内细胞附着的那边显出云雾状。它的范围取决于培养瓶中细胞成圆的程度和细胞的密度。极其重要的是培养物不能过度胰蛋白酶消化，因为这样可能导致早熟的细胞裂解而明显损失 RNA 和 DNA。

⑤ 对着手掌打击培养瓶，从基底层逐出细胞。如果细胞没有完全分离，在手掌里温热培养瓶或者在 37℃保温 60s。再打击培养瓶确保分离。

❶ 折射率是光线从空气通过另一种介质（这里是细胞质）时弯曲的角度。

注意 完全逐出细胞必须打击培养瓶 3～4 次以上。如果还有些细胞仍然附着在壁上，需要让它们与胰蛋白酶接触时间长一点。只有用 PBS 洗过后细胞培养物才能再次用胰蛋白酶消化。而且，如果必须再次用胰蛋白酶消化，一定保留第一次胰蛋白酶处理后加入的培养介质（上清液），因为可能大量细胞已经脱落。悬浮的细胞应当保存在冰上直到细胞群体被胰蛋白酶消化为止。然后细胞可以倒入普通管子中。

⑥ 细胞从瓶壁分离后，立即在培养瓶中加入 5ml 步骤①保存的培养液，以钝化残留的胰蛋白酶。

注意 有些细胞培养物对胰蛋白酶极度敏感。在这些场合，细胞分离后加入一种胰蛋白酶专一的抑制剂使胰蛋白酶失活。如果是分离的细胞再次悬浮在无血清培养基中也是可以的。可以参考本书提供的细胞株和培养基配制的信息。

⑦ 将悬浮液转移到一个合适的离心管中，150×g～200×g 离心 3～5min。

⑧ 离心后要尽可能完全地去除上清液。为了确保裂解缓冲液的关键成分不被稀释或因为与残留的培养基相互作用而发生变化，这一点是非常必要的。如果细胞培养基的去除有问题，必须用 PBS 洗细胞沉淀物，然后再重复步骤⑦和步骤⑧。

⑨ 为了促进细胞在裂解缓冲液或其他试剂中的悬浮，步骤⑧已去除上清液之后，在加入裂解缓冲液之前，轻扣装有细胞的管子是非常有效的。在本实验室，在加入裂解缓冲液后，立即将装有细胞的管子沿着微量离心管架拖拉 2～3 次以帮助细胞沉淀的破碎。

附录 11　用盐析法分离高分子量 DNA

Miller 等人（1988）建立了不用有毒有机溶剂来分离高分子量（HMW）DNA 的方法，下面是这个方法的改良方法。其他方法都说明了 HMW DNA 的回收率，包括透析（Longmire 等，1987）和使用过滤器（Leadon 和 Cerutti，1982）。生物工程产品销售商提供的用途很广的一些试剂盒，都是以这些方法和这里要叙述的方法为依据的。

这个方法相对简单，涉及细胞蛋白质的盐析。它开始用蛋白酶 K 水解多肽，接着用饱和 NaCl 溶液沉淀蛋白质；随后去蛋白质的基因组 DNA，用标准的盐及乙醇沉淀回收。该方法已经成功地从有核的血细胞中分离得 DNA（Miller 等，1988）。本实验室也成功地用此方法分离得 DNA，所用样品是各种胰蛋白酶消化的间叶起源的细胞（Farrell，1991～2004；未发表）。本实验室得到的基因组 DNA 通常比用苯酚：氯仿纯化得到的平均要高 10%～15%。用紫外分光光度计扫描并检查 A_{260}/A_{280}（第 8 章），表明该方法所得 DNA 的纯度与苯酚：氯仿蛋白质抽提技术所得的相比是一致的。

11.1　实验方案

① 收获细胞于一个 15ml 的离心管中，200×g 离心 5min。每管中使用约（1～2）×10^7 个细胞。

② 倒去上清液。在总体积为 4.5 ml 的 TE-9 裂解缓冲液（500mmol/L Tris-Cl，pH 9.0；20mmol/L EDTA；10mmol/L NaCl）中彻底悬浮细胞沉淀（直至 2×10^7 个细胞）。

选择方案：用 PBS[1] 洗沉淀，并且在加裂解缓冲液之前再离心一次。

注意 1 这种裂解缓冲液的碱性 pH 是符合需要的，因为它将诱导样品中 RNA 的部分水解。但是还

[1] 1×PBS(每升)=8g NaCl，0.2g KCl，1.15g Na_2HPO_4，0.2g KH_2PO_4。如果需要，可以制备浓的储备液，使用前用无菌水稀释。

不足以引起双链 DNA 的严重变性（第 1 章）。

注意 2　对少数没有起始细胞数目的，所有试剂的体积都应当按比例缩减。

③ 裂解液中加入 500μl 10%的 SDS。反转试管激烈混合。

④ 再加入 125μl 20mg/ml 的蛋白酶 K（终浓度为 0.5mg/ml），反转试管激烈混合。48℃ 保温 4～20h。

注意　加入蛋白酶 K 是必要的，至少可以部分水解核小体蛋白。如果不除去，组蛋白和其他核蛋白将会与 DNA 一起纯化，继而干扰 DNA 的内切酶消化和其他下游应用。

⑤ 保温结束，准确加入 1.5ml 饱和 NaCl 溶液（约 6mol/L）。激烈振摇 15s。试管放置 1～2min 观察裂解液的状况。进行到适当时候，多肽沉淀将使裂解液变得非常模糊混浊，并一直保持这种状况。

注意　加入一份饱和 NaCl 溶液，就可以使多肽盐析出来。实质上这是一种脱水技术。如果在激烈振摇试管后 1min 内裂解液澄清了，则盐析不彻底。如果需要，再加一份 200μl 的饱和 NaCl 溶液，振摇，并观察裂解液的状况。如果需要，再重复加入饱和 NaCl 溶液直到裂解液保持混浊状态。但是不能过度使用饱和 NaCl 溶液，因为到某一点有固体 NaCl 析出溶液时，将导致 DNA 得率明显下降。

⑥ 裂解液 1000×g～1500×g 离心 10min。注意离心力不要超过推荐的最大值。

⑦ 将上清液倒入一个新的 15ml 管子中，借着 SDS 起泡捕集残留的蛋白质。再离心 10min。

⑧ 将上清液（含有 DNA）倒入一个新的 50ml 圆锥形离心管中，如果有的话，小心避免蛋白质沉淀破碎。弃去蛋白质沉淀。

⑨ 在装上清液的管中加入 2 倍体积的室温 95%乙醇。使离心管旋转或者轻缓地反转直到可以看到 DNA 沉淀。

注意　这里推荐室温乙醇是因为这时只有 DNA 会很快沉淀出来；冰冷的乙醇会让一些残存的 RNA 也沉淀出来。

⑩ 用硅烷化的巴斯德移液管（Sigmacote 是非常有用的；见附录 8）回收 DNA。要确保 DNA 不被吸到移液管中超出硅烷化的部分。另一种办法是，DNA 沉淀 500×g 离心 1min 收集。这两种方法得到的 DNA 都进一步转移到一个微量离心管中。

注意　某些场合，巴斯德移液管的尖端可以加热并弯曲（在本生灯的火焰上）成钩形并用来钓出溶液中的 DNA。因为 DNA 会牢固地黏着在未处理的玻璃表面，所以硅烷化是必需的。

⑪ 用 500μl 一份的 70%乙醇洗 DNA 3 次，洗去残留的盐。最后用 95%乙醇洗，这将加速 DNA 沉淀的干燥。不要让 DNA 完全干燥。

⑫ 在使用 DNA 之前，包括测定浓度和纯度之前，用 100～200μl TE 缓冲液（10mmol/L Tris-Cl，pH 7.5；1mmol/L EDTA）完全溶解 DNA。溶解的基因组 DNA 样品可以长时间保存在 4℃。

注意 1　45～50℃保温样品有助于 DNA 的溶解。如果 37℃保温可能促进 DNase 活性。在本实验室，纯化了的基因组 DNA 样品是 4℃过夜溶解。

注意 2　除了紫外分析之外，样品的完整性应当用电泳评估，250～500ng 样品用 λ *Hind* Ⅲ标准在小型凝胶上电泳。

⑬ 如果需要，样品可以用无 DNase 的 RNase 处理并且再沉淀 DNA，去除污染的 RNA。

⑭ 纯化的 DNA 4℃ 保存。冷冻可能会损害样品的完整性。

11.2 参考文献

Leadon, S. A., and Cerutti, P. A. (1982). A rapid and mild procedure for the isolation of DNA from mammalian cells. *Anal. Biochem.* **120,** 282.

Longmire, J., Albright, K., Lewis, A., Meincke, L., and Hildebrand, C. (1987). A rapid and simple method for the isolation of high molecular weight cellular and chromosome-specific DNA in solution with the use of organic solvents. *Nucleic Acids Res.* **15,** 859.

Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16,** 1215.

附录 12 从植物组织中分离 RNA

从植物中制备的 mRNA 与从动物中制备的 mRNA 有很多共同之处。并且在许多场合，证实植物来源的 mRNA 在多种条件下具有明显的稳定性。虽然属于植物基因表达研究的细节涉及本书许多主要的研究项目，但是从植物中分离 RNA 的技术是本书范围之外的。照此，读者可以参阅下列参考资料：

Ainsworth, C. (1994). Isolation of RNA from flora tissue of *Rumex acetosa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12,** 198.

Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11,** 113.

Graham, G. C. (1993). A method for extractions of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11,** 32.

Green, M. J., Thompson, D. A., and MacKenzie, D. J. (1999). Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **83,** 482–485

Lewinsohn, E., Steele, C. L., and Croteau, R. (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12,** 20.

Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163,** 16.

López-Gómez, R., and Gómez-Lim, M. A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort. Sci.* **27,** 440.

Mitra, D., and Kootstra, A. (1993). Isolation of RNA from apple skin. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11,** 326.

Palmiter, R. D. (1974). Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **13,** 3606.

Soni, R., and Murray, J. A. H. (1994). Isolation of intact DNA and RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **218,** 474.

Strommer, J., Gregerson, R., and Vayada, M. (1993). Isolation and characterization of plant mRNA. *In* "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (B. R. Glick and J. E. Thompson, Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.

Wallace, D. M. (1987). Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **152,** 41.

Wan, C. Y., and Wilkens, T. A. (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton. *Anal. Biochem.* **223,** 7.

附录 13 电泳——原理、参数和安全

电泳是在电场中迅速分辨带电荷的生物大分子（包括蛋白质、核酸和碳水化合物）的一

种技术。由于蛋白质的两性性质，由环境的 pH 决定它的净电荷；与此不同，在电泳使用的任何 pH 环境里，核酸都表现为净的负电荷。实际上，核酸的电泳图谱已经成为一种标准工具，用来定性和定量地表示样品的特征，以及测定样品的纯度。与其他麻烦的方法（如密度梯度离心）相比较，电泳是高效快速的，它可提供高分辨率。而密度梯度离心，可以为了除印迹分析外的多种目的，按分子大小分离 RNA 分子。核酸可以借助凝胶染色而直接观察，这就能够目视检查分离过程；它也为样品完整性提供了可靠的评估方法。并且在大多数情况下，研究者都能够以各种方法回收特定的条带用于随后的鉴定。电泳也是一种用来浓缩 RNA 和 DNA 之类物质的有力技术。控制电泳的参数，使相同大小的分子一起移动。

历史上，这种技术的最早应用涉及蔗糖中的大分子色谱。方法学方面的改进，使电泳扩展到淀粉凝胶，最后发展了聚丙烯酰胺凝胶电泳。这种凝胶的结构影响着目标分子的迁移特征。人们很快认识到，大孔的聚丙烯酰胺凝胶是高分子量核酸有效电泳所必需的。开始使用浓度很低的聚丙烯酰胺凝胶（2.5%），然而浓度如此低的聚丙烯酰胺凝胶，它的不稳定性和不可靠性妨碍了其广泛应用。后来，琼脂糖（一种从海藻中提出的线性多聚糖）加到聚丙烯酰胺凝胶中（Peacock 和 Dingman，1968；Dahlberg 等，1969），增加了凝胶的物理强度。现在用于核酸分离的琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶都能获得令人满意的结果。使用哪一种凝胶取决于样品分子量的大小范围。目前用于核酸电泳的两种标准基质是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。通常在变性条件下进行 RNA 电泳。少数情况下，RNA 可以用双向电泳鉴定（有关综述见 DeWachter 等，1990）。

13.1　理论描述❶

下列等式描述了带电分子在蔗糖中的理论行为；实际上，这里描述的其他参数也包括了凝胶基质中带电分子的确切行为。下面无意在电学方面展开，但是对理解什么是电泳和怎么做电泳来说，了解一些基础知识是很必要的。

当一个分子置于电场中时，施加在它上面的力（F）取决于分子的净电荷（q）和它所在电场的强度（E/d）。所以：

$$F=\frac{Eq}{d} \tag{13-1}$$

式中　E——电极之间的电位差；

　　d——电极之间的距离。

现实中，一种摩擦力即阻力与分子向电极迁移的方向相反。这个摩擦力（F）取决于分子的大小和形状（半径，r）以及它通过的介质的黏度（η）；v 是分子移动的速度。

$$F=6\pi r\eta v \tag{13-2}$$

合并式(13-1) 和式(13-2)，得到：

$$\frac{Eq}{d}=6\pi r\eta v \tag{13-3}$$

用代数重新整理等式得到分子在电场中移动的速度为：

$$v=\frac{Eq}{d6\pi r\eta} \tag{13-4}$$

经验 1：从式(13-1)～式(13-4) 可知分子的移动速度与电场强度和净电荷成正比，而与

❶ 部分改编自 Hoefer Pharmacia Biotech。

分子的大小和溶液黏度（胶的硬度）成反比。

有关电学上两个参数的知识，是理解电泳机制的基础。首先是欧姆定律，电流（I，安培）与电压（E，伏特）成正比，而与电阻（R，欧姆）成反比。所以：

$$I=E/R \tag{13-5}$$

第二个是功率（P，瓦特），产生热量的度量标准，它是电压（E，伏特）和电流（I，安培）的乘积，可以表达为：

$$P=EI \tag{13-6}$$

从式(13-5) 得到 E 为 IR 的乘积，则式(13-6) 可以表达为：

$$P=I^2R \tag{13-7}$$

电泳时，总有一个参数保持稳定，电压、电流或者功率。电泳期间，因为电解液耗尽、温度波动等，电阻增大造成如下不同结果。

① 选择恒电流时，速度与电流成正比，产生热而分子移动速度保持恒定。

② 选择恒电压时，带电分子的移动速度减小，但是电泳过程中产热量并不增加。

③ 选择恒功率时，带电分子的移动速度减小，但是电泳过程中没有相关的产热变化。

经验 2：温度调节是在整个电泳过程中都需要关注的，特别是在进行琼脂糖凝胶电泳时。过度发热将会使凝胶基质在非常短的时间里融化，所以维持恒定的温度是非常重要的。

让电流从阴极流向阳极的反应如下：

阴极反应

$$2e^- + 2H_2O \longrightarrow 2OH^- + H_2$$

$$HA + OH^- \rightleftharpoons A^- + H_2O$$

阳极反应

$$H_2O \longrightarrow 2H^+ + \frac{1}{2}O_2 + 2e^-$$

$$H^+ + A^- \rightleftharpoons HA$$

这些反应描述了电泳缓冲液中水的电解，结果在阴极产生氢气而在阳极产生氧气。每产生 1mol 氢气，就会产生 0.5mol 氧气。直接观察阳极，能够看到产生的气泡大约是阴极产生的一半。虽然这不一定是确定电极是否正确连接的最好办法，但肯定是一个表明电流在流动的简单办法和标志。

13.2 典型的电泳分离

RNA 电泳可以用几种方法中的任意一种，这些方法都有几个共同的特点。典型的做法，RNA 在一个相对小的体积（20μl 或更小）里变性，上样于水平琼脂糖凝胶块的孔内，并且凭经验决定电泳时间。当然，支配大分子的参数在这儿也是适用的。有几个因子影响核酸电泳迁移率（Rodbard 和 Chambach，1970）：实验室电泳装置一旦确定了最适参数，建立标准的实验格式，对数据的重复性很可能有好处。

13.3 基质的选择

与琼脂糖凝胶相比，聚丙烯酰胺凝胶显示了大得多的张力强度，而且有较强的分辨能力；但是琼脂糖凝胶允许研究者在很大的分子量范围内分离核酸分子（附表 13-1）。因为琼脂糖凝胶的网孔比较大，允许有效分离像核酸、大蛋白质甚至蛋白质复合物这样的巨大分子。相比之下，聚丙烯酰胺凝胶是小网孔的，能够用来分离小于平均分子量的蛋白质和寡核

苷酸。通常作为基质的琼脂糖和聚丙烯酰胺，凝胶越硬，它的分辨能力就越强。琼脂糖凝胶可以用来电泳小至150个碱基到大至50000个碱基（50kb）的核酸分子，取决于琼脂糖的浓度和精确的电场性质（恒定电场或者脉冲电场）。相比之下，聚丙烯酰胺凝胶常规用来分离分子小至5～10个碱基、大到500～600个碱基的核酸。在考虑用聚丙烯酰胺凝胶对仅相差一个碱基的核酸分子测序时，就可以理解该凝胶的分辨能力了。

附表 13-1　核酸电泳中，琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶的有效范围①

基质类型	浓度(g/100ml)/%	有效范围/个碱基
琼脂糖②	0.6	1000～20000③
	0.8	600～10000
	1.0	500～9000
	1.2	300～6000
	1.5	200～3000
丙烯酰胺④	3.5	100～1500
	5.0	80～500
	8.0	60～400
	12.0	40～200
	15.0	25～150
	20.0	6～100

① 表中的数据部分来自 Sambrook 和 Russell（2001），Ogden 和 Adams（1987），Farrell（1993）。

② 由3%琼脂糖组成的琼脂糖凝胶，可以用来观察 PCR 产物（100～500bp）。

③ 可以用脉冲电场电泳，有效分辨比较大的 DNA 分子。

④ 凝胶的组成：丙烯酰胺：*N*,*N*′-亚甲基双丙烯酰胺＝19∶1。

当心　单体丙烯酰胺，即非聚合形式的丙烯酰胺，是一种很强的神经毒素，在制备凝胶和操作丙烯酰胺时应当找有经验的人帮助。

现在可以很方便地从许多供应商处买到预制胶，而且有现货供应大部分各式各样的标准电泳槽。另外，琼脂糖基本是无毒的，电泳时用它操作、制胶和丢弃都简单易行。

聚丙烯酰胺凝胶可以被制成各种各样的形状，但是琼脂糖凝胶传统上是以水平板状灌注制胶和电泳的。这种构型是合适的，因为琼脂糖凝胶完全被它下方的灌注盘支撑着。有些垂直的装置适应了琼脂糖凝胶较软的特性，包括一块磨砂玻璃板，凝胶可以附着在上面。聚丙烯酰胺凝胶借着它具有大得多的物理强度，在垂直的装置中几乎都可以电泳。可以灌注成板状或者圆柱状，而且通常固定在两个各有一电极的缓冲液槽之间，以致两个缓冲液槽之间只有通过凝胶才能接通电流。相反，水平放置的琼脂糖凝胶完全是浸泡在电解缓冲液中的，缓冲液的体积要尽可能小，但是必须完全覆盖住凝胶。在室温下或者电压相当低时跑胶，这有助于适度散热。

当实验设计需要在电泳后将 RNA 印迹或转移出凝胶时，例如传统的 Northern 分析，选择琼脂糖作为基质，RNA（Southern 分析的 DNA）可以从中完全印迹。此外，许多与制备型琼脂糖凝胶电泳有关的经典问题，即污染物从琼脂糖凝胶中一起共洗脱，以及洗脱中的困难，广泛使用极高纯度的熔点低的琼脂糖可避免这些问题。

13.4　琼脂糖的纯度

琼脂糖是来自琼脂的一种高度纯化的多糖。就像商业上可以得到的所有分子生物学

试剂一样，琼脂糖有几个等级，它们中有许多至少含有痕量丙酮酸盐和硫酸盐阴离子（它们可能产生电渗）。应当使用的是，已证明其仅含低量污染物（包括多糖和盐）以及完全没有核酸酶活性的高质量的分子生物学级别的琼脂糖。上述污染物可能干扰以后从凝胶中回收核酸（特别是 DNA）的处理。高纯度级别的琼脂糖，例如 SeaKem 和 NuSieve (Cambrex Bio Science)，它们没有核酸酶活性和上面提及的大多数污染物。用于特殊应用的、特殊的低熔点琼脂糖即低凝胶化温度的琼脂糖，也有现货供应。读者可以参考出版物《DNA 分离与分析的指南全集》(Your Complete Guide for DNA Separation and Analysis)，由 Cambrex (800-341 1574; formerly FMC BioProducts) 出版的这本指南，是一本优秀的实验室手册。

13.5 琼脂糖浓度

琼脂糖的浓度（凝胶的硬度）极大地影响着迁移的速度；任何一个一定大小分子的迁移率都会因琼脂糖浓度的变化而不同。这是因为琼脂糖凝胶的网孔大小取决于凝胶中琼脂糖的浓度。在凝胶的几乎全长范围内，迁移速度都是线性的，非常大或非常小的分子可能在凝胶的线性范围之外。如果发生这种情况，明显的误差可能出自于，根据与在凝胶线性范围内的分子量标准比较评估分子大小的做法。此外，在染料的前面（就是所谓凝胶的“前沿”）经常可以看到一定量弥散的低分子量物质，在低于 1%的琼脂糖凝胶中特别要注意这一点。通常琼脂糖凝胶的工作浓度在 0.6%～1.5%。但是在特殊情况下，也可以用更高或更低的浓度（如用 3%的琼脂糖凝胶分析 PCR 产物）。

13.6 聚丙烯酰胺的浓度

聚丙烯酰胺凝胶提供了比琼脂糖凝胶大得多的张力强度。在凝胶形成过程中，丙烯酰胺单体[1]依靠交联剂聚合成长链。实际上交联剂也一起支持着它的网络结构。最常用的交联剂是 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺，简称 bis。其他交联剂也偶尔用之，它们的特殊性质有助于聚丙烯酰胺的溶解。可以预先决定聚丙烯酰胺凝胶网孔的大小：①调节丙烯酰胺的总百分数；②改变加入的交联剂数量，加入交联剂的目的是诱导丙烯酰胺的聚合。在研究材料分子量范围很宽的时候，研究者可以制备一种网孔梯度凝胶，其中较大的网孔在胶的上部而不是底部。因此，在电泳过程中凝胶变得更加有限制。

13.7 样品的分子量范围

核酸分子迁移的速度与构成分子的碱基数（对双链 DNA 或 DNA：RNA 杂交链而言是碱基对）的 $\log_{10}$ 成反比。确实，分子越大，摩擦系数（或拖拉系数）就越大，即分子表现为被拖过基质几何形状的网孔 (Helling 等，1974)。用至少 2 个标准分子量核酸，分别以它们的 $\log_{10}$ 核苷酸数对它们的迁移距离（cm）[即离原点（上样孔）的距离] 作图，就很容易地构建电泳分离 RNA 的标准曲线。常规是应用图像分析软件作图。

13.8 核酸的构型

DNA 的迁移率很大程度上受分子拓扑影响（见 Sambrook 和 Russell，2001）。RNA 的

[1] 单体丙烯酰胺是一种非常强的神经毒素。必须按照制造商推荐的所有安全防护说明极其小心地使用它。

电泳行为也受二级结构的影响和被改变，例如非变性 RNA 经常呈现的发夹结构。为了迫使同类 RNA 共迁移，RNA 的电泳常规是在变性条件下进行的（第 10 章）。

13.9　电压

有效的散热直接与凝胶的分辨能力有关。琼脂糖凝胶电泳时，必须确定所用电压不会引起凝胶过热。在比较低的电压下电泳时，凝胶可以直接冷却，这是电泳槽结构的直接功能。例如，垂直型凝胶的散热比水平式的快得多。此外，带有铝制衬垫的电泳槽，导热要比相当厚度的玻璃快许多倍。在一些场合，可能需要在电泳槽周围不断地泵水冷却以保持足够低的温度和得到平整而高分辨的条带。这样设计的装置一般都配备有管道。凝胶在过高电压下电泳，分辨率将出现明显的下降；而且如果系统变得太热，凝胶就会融化。琼脂糖凝胶决不能在两个电极之间以高于 5V/cm 电泳；当然，凝胶可以在很低的电压下电泳。一般胶跑得越慢，分辨率就越好（2～10kb 的范围）。如果琼脂糖凝胶电泳保持在这些参数内，就不需要冷却系统了。

13.10　溴化乙锭

当心　溴化乙锭是一种强烈的致突变剂。操作和处理它时都必须十分当心，并且要按照制造商的指南做。处置详情见附录 4。

天然 DNA 以双链形式存在，并且在电泳期间，它的迁移深受溴化乙锭的影响。与 DNA 不同，RNA 的结构不会因为琼脂糖凝胶和电泳缓冲液中加入溴化乙锭而受到本质性的影响。使用时，溴化乙锭（10mg/ml 的储备液）经常被稀释到终浓度为 0.5μg/ml。这种染料能减慢样品迁移速度 15%左右。电泳结束后，凝胶的染色和脱色一般都很容易并且不至于忙乱。事实上担心的是，溴化乙锭在 Northern 印迹和 Southern 印迹期间可以分别干扰 RNA 和 DNA 的转移效率。如果在制胶时直接将溴化乙锭加入凝胶，要确定把它也加到电泳缓冲液中，否则因此将耗尽凝胶中的染料。其原因是，RNA 电泳时样品是从负极向正极移动，而溴化乙锭是从正极向负极移动。但是，如果电泳时间短，例如，检查大小、质量或者完整性时，把溴化乙锭加到电泳缓冲液中不是必需的。问题只是发生在电泳时，核酸和溴化乙锭互相向相反的电极迁移。关于溴化乙锭优点和缺点及其他染料更全面的讨论见第 10 章。

13.11　SYBR 绿

当心　SYBR 绿虽然不像溴化乙锭那样具有致突变性，但是应当像对待所有核酸结合染料一样，小心处理。要按照制造商的指南，十分小心地处理和处置它。处置详情见附录 4。

三个新的相关染料，即 SYBR 绿Ⅰ、SYBR 绿Ⅱ和 SYBR 金（分子探针），已经在核酸电泳中广泛使用。与溴化乙锭相比，SYBR 染料具有明显的优点，例如高灵敏度、低背景和较小的致突变性；这些差异在第 10 章有更详尽的讨论。

制胶时把任何 SYBR 染料加到融化的胶中都是不合适的，因为染料对 RNA 和 DNA 的迁移模式有负面影响。在有 SYBR 绿时，凝胶电泳显示出模糊的条带，高度不规则，并且常常不能与附近的其他条带分开。这种现象似乎发生在所有浓度的 SYBR 绿和所有电压情况下。在笔者实验室，样品先电泳，然后用 SYBR 绿Ⅰ或者 SYBR 金染色。电泳以后再染

色，效果非常好。

13.12 碱基组分和温度

与聚丙烯酰胺凝胶不一样，核酸在琼脂糖凝胶中的迁移不受它们的碱基组分影响。此外，核酸在琼脂糖凝胶中的电泳行为，在4℃到室温之间没有可估量的变化。但是凝胶过热还是很令人担心的事。核酸样品常规在室温下进行琼脂糖凝胶电泳。

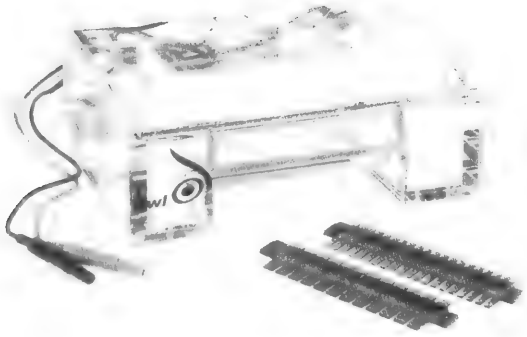
13.13 电场方向

常规电泳都是在一定方向的电场中分离核酸分子。使用脉冲电场进行凝胶电泳，已经克服了过去经典电泳方法对分子大小的限制（Schwartz 等，1982）。这种技术迫使 DNA 分子周期性地适应从一个电场方向转向另一个方向。这种方法是高效的，分离 0.1～10Mb 的 DNA 分子，甚至完整的染色体都是可重复的。这种变化电场方向的技术，一般不能用于 RNA 电泳，因为天然 RNA 是很小的分子。

13.14 电泳槽的类型

历史上琼脂糖凝胶要铸型并且是水平式平板电泳，这是因为琼脂糖凝胶的张力强度很低。水平配置使凝胶置于完全支持之中，这样可以用浓度低的凝胶很方便地有效分离范围很宽的核酸样品。虽然不同设计和不同规格的电泳槽到处都可以购买到，毫无疑问值得买坚固耐用的电泳槽，这样的电泳槽可以经得起正常实验室几年的磨损。琼脂糖不像单体丙烯酰胺那样有毒性，很容易在工作台上（如果要加毒性变性剂则在通风橱中进行）浇铸成凝胶块以及进行电泳。

实际中，凝胶灌注盘的开口端必须密封并保留融化的琼脂糖直到固化为止。有些较新的设计加入了与结构连在一起的橡胶垫圈，当灌注盘与电泳方向成 90°，插进电泳槽中则它就被密封了（附图 13-1）。这种设计不需要用胶带贴边，并且也排除了老式灌注盘常有的渗漏现象。



附图 13-1 带有垫圈的中号电泳槽。注意凝胶浇铸灌注盘和梳子的定位。在琼脂糖固化后，灌注盘旋转 90°，梳子形成的孔在电场方向。Owl Separation Systems 惠赠

比较好的电泳凝胶盒具有各种各样的梳子，它们可以用来制成不同尺寸不同数目的上样孔。一般梳齿是 1mm、1.5mm、2mm 或 3mm 厚，每块胶能够产生 10～20 个孔。也可以根据需要购买带有缓冲液出口或者带有能够调节缓冲液流通循环端口的电泳凝胶盒。例如，用

磷酸盐或者其他不能抵抗 pH 变化的缓冲液，就像电泳乙醛酸化 RNA（第 10 章）那样，避免形成 pH 梯度是关键。

13.15　电泳的安全问题

安全性也必须是涉及电泳装置选择的因素。在电泳时或者电源已插在插座上时，千万不要接触凝胶、电泳槽或电源。不应当企图修改电泳槽或者电源的设计，任何改变对操作者和实验室的同事都会带来重大的风险。设计良好的系统在有电流时，不可能打开或移动盖子。有些设计，盖子是可滑出的，可以在盖子接近电泳槽的内部前断开电流。这就允许安全地检查电泳过程了。若要恢复电流和继续电泳，盖子必须复位。在接近电泳槽检查系统时，可以机敏地从电源和凝胶盒处断开导线接头。许多较新型的电源配置了可接纳两套凝胶盒的导线接头。在用导线接头连接电源和凝胶盒之前，必须确定电源是断开的；把第二套导线接头（另一个凝胶盒）连接到已经在运行的电源之前，必须关闭电源。当所有的连接都恰当地完成后，电源才能够再打开。当要断开任何导线接头之前，必须确认电源是关闭的。决不要同时拿着两个导线接头，这样可能造成环路而触电。

13.16　电泳装置的维护

在大多数分子生物学实验室，电泳也许是每天的例行公事。因为优质的电泳槽和电源可能需要投入几千美元，也因为有潜在的危险，所以决不可以忽视对仪器的保养。电泳仪器的基本维护是经济有效的和强制性的。

电泳的电泳槽和电源的合理维护及使用是一件重要的事情，但是部分实验室经常忽略这一点。很清楚，操作者的责任是必须按一个固定的程序检查电线、连接处和电极，以防止发生潜在威胁生命的伤害。

可能最常见的问题，是电源的接头、电极的绝缘导线接头和电插头处裸露的铜导线暴露在外。这种状况具有严重的电击休克危险。通常以一定的花费从制造商或者经销商处可以购买到置换用的绝缘导线，而在仪器最初购买时预定一些附件是最值得的。此外，所有电源绝缘导线、绝缘座、电极、连接螺旋套和密封垫圈，实验室都应当规定每周或者每两周检查一次。关于电泳仪器维护的详细制度见 Landers（1990）。

13.17　参考文献

Dahlberg, A. E., Dingman, C. W., and Peacock, A. C. (1969). Electrophoretic characterization of bacterial polysomes in agarose-acrylamide composite gels. *J. Mol. Biol.* **41,** 139.

DeWachter, R., Maniloff, J., and Fiers, W. (1990). Two-dimensional get electrophoresis of nucleic acids. *In* **"Gel Electrophoresis of Nucleic Acids—A Practical Approach" (D. Rickwood and B. D. Hames, Eds.). IRL Press, Washington, DC. pp. 151–200.**

Farrell, R. E., Jr. (1993). "RNA Methodologies. A Laboratory Guide for Isolation and Characterization." Academic Press, San Diego, CA.

Helling, R. B., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1974). Analysis of R. *Eco***RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis.** *J. Virol.* **14,** 1235.

Landers, T. (1990). Electrophoresis apparatus maintenance. *Focus* **12(2),** 54.

Ogden, R. C., and Adams, D. A. (1987). Electrophoresis in agarose and acrylamide gels.

Methods Enzymol. **152,** 61.

Peacock, A. C., and Dingman, C. W. (1968). Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* **7,** 688.

Rodbard, D., and Chambach, A. (1970). Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **65,** 970.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (Eds.). (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M., and Cantor, C. R. (1982). New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47,** 189.

附录 14　聚丙烯酰胺凝胶电泳

当心　单体丙烯酰胺是一种非常强的神经毒素，它很容易通过皮肤吸收。制备聚丙烯酰胺凝胶时必须十分小心。无论是使用固态还是液态的丙烯酰胺，都必须戴口罩和手套。永远不要认为聚合的丙烯酰胺对健康就不具危险。如果你不熟悉安全制备和使用聚丙烯酰胺凝胶的方法，请找有此技术的人员协助。欣慰的是现在大多数实验室都购买预制的聚丙烯酰胺凝胶而不必使用有毒的前体了。

丙烯酰胺单体聚合生成的聚丙烯酰胺凝胶[1]，是由线性链状分子以及与这些链状分子交联的 *N*,*N*′-亚甲基双丙烯酰胺（bis）组成的。在聚丙烯酰胺凝胶中，核酸分子的筛分直接与丙烯酰胺的浓度以及丙烯酰胺与 *N*,*N*′-亚甲基双丙烯酰胺的比例有关。

因为氧气抑制聚合反应，所以单体的混合物必须除去空气。可以在混合物中通入惰性气体，或用真空泵抽气。

灌凝胶时，不是灌入管中就是制成平板，凝胶的顶部都会形成新月面。如果忽略了这一点，凝胶不平整的顶部会引起条带变形。为了消除新月面，聚合之前，在凝胶混合物的表面小心地加一薄层水或水饱和的正丁醇。聚合完成后，让水或丁醇流出，凝胶的上部就留下了一个平整的表面。这层水或正丁醇不仅消除了新月面，而且隔绝了凝胶表面与抑制聚合反应的氧气间的接触。

可以用两种方法预测凝胶孔径的大小。一种方法是调节丙烯酰胺的总百分比，即丙烯酰胺单体和交联剂质量的总和，以%T 表示。例如，20%T 的胶含有 20%（200g/L）的丙烯酰胺加 bis。%T 增加，则孔径减小。

另一种调节孔径的方法是改变交联剂的量，以单体和交联剂总量的百分比表示，即%C。例如，20%T 5%C_{bis}的凝胶含有 20%（200g/L）的丙烯酰胺加 bis，而且 bis 占丙烯酰胺总质量的 5%。发现任意的%T 配以 5%的交联剂，都会形成最小孔径的胶。高于和低于 5%时，孔径都会增大。待研究材料的分子量范围很宽时，研究者可以制备一种梯度胶。梯度胶中，顶部的孔径比底部的大；电泳过程中，凝胶的限制性较大。

聚丙烯酰胺凝胶的聚合有化学方法和光化学方法。最常用的化学方法中，过硫酸铵和 TEMED（*N*,*N*,*N*′,*N*′ 四甲基乙二胺）分别用作起始剂和催化剂。在光化学方法中，使用核黄素和 TEMED，用荧光光源的长波长紫外线照射凝胶混合物起始光化学反应。光化学聚

[1] 得到 Hoefer Pharmacia Biotech 允许并改编。

合仅限于蛋白质研究，因蛋白质对过硫酸铵和化学反应的副产物敏感。这种聚合方法不适用于 RNA 的测量。

聚合反应会产热。如果产热太厉害，未聚合的凝胶会形成对流，导致凝胶结构的不一致性。为了防止过度发热，起始剂和催化剂的浓度应当调节到在 20～60min 内完成聚合。

14.1　分析型凝胶电泳

常规用于 RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳的两种变性剂是甲酰胺（终浓度 98%）和尿素（终浓度 7mol/L），它们的选择主要取决于样品中分子量的大小。分子量小于 200 个核苷的，用含尿素的凝胶最好。而若要准确地测定 200～1000 个核苷分子的长度则必须使用含甲酰胺的凝胶。

平板聚丙烯酰胺凝胶是灌注在两片干净的玻璃板之间的，玻璃板之间用垫片（厚度 1～2mm）隔开。用垂直装置进行核酸电泳时，在玻璃板两侧冷却胶，其好处在于通常可以消除因热变形而造成的“微笑型条带”。从凝胶里回收核酸时需要接着电泳，凝胶的厚度最好薄至 0.5mm。就琼脂糖凝胶而言，包括聚丙烯酰胺凝胶，最普通的程序是电泳后要使样品可视化。一种方法是用溴化乙锭、吖啶橙或某种 SYBR 染料染色，可以目测电泳后核酸样品的分布状态。放射性标记的核酸电泳后，可以用另一种方法——放射自显影法可以使凝胶中的分子定位。与标准的印迹分析不同（例如 Northern 印迹），在这些条件下放射自显影不需要凝胶转移，因为电泳前已经标记和/或杂交了，例如，S1 核酸酶保护实验和 RNase 保护实验。关于聚丙烯酰胺凝胶制备和聚丙烯酰胺凝胶电泳机制的详尽讨论，读者可以参考 Berger 和 Kimmel（1987）、Sambrook 和 Russell（2001）。

14.2　参考文献

Berger, S. L., and Kimmel, A. R. (1987). “Guide to Molecular Cloning Techniques.” Academic Press, San Diego, CA.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). “Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

附录 15　仪器、试剂和服务的供应商

Ambion, Inc.
2130 Woodward
Austin, TX 78744
800-888-8804
www.ambion.com

Amersham Biosciences
Corporation
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway, NJ 08855
800-526-3593
www.amershambiosciences.com

Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
800-345-5224
www.appliedbiosystems.com

BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
877-232-8995
www.bdbiosciences.com

Beckman Coulter, Inc.
4300 N. Harbor Boulevard
Box 3100
Fullerton, CA 92834
800-742-2345
www.beckman.com

Bellco Glass, Inc.
340 Edrudo Road
Vineland, NJ 08360
800-257-7043
www.belcoglass.com

Bio-Rad Laboratories
3300 Regatta
Hercules, CA 94547
800-424-6723
www.bio-rad.com

Brinkmann Instruments, Inc.
One Cantiague Road
P.O. Box 1019
Westbury, NY 11590-0207
800-645-3050
www.brinkmann.com

Calbiochem
P.O. 12087
La Jolla, CA 92039-2087
800-854-3417
www.emdbiosciences.com

Cambrex Bio Science
191 Thomaston Street
Rockland, ME 04841
800-341-1574
www.cambrex.com

Clontech Laboratories
BD Biosciences Clontech
1020 E. Meadow Circle
Palo Alto, CA 94303-4230
800-662-2566
www.clontech.com

Cole-Parmer Instrument Company
625 E. Bunker Court
Vernon Hill, IL 60021
800-323-4340
www.coleparmer.com

Dharmacon
2650 Crescent Drive, #100
Lafayette, CO 80026
800-235-9880
www.dharmacon.com

Diversified Biotech, Inc.
1208 V.F.W. Parkway
Boston, MA 02132
800-796-9199
www.divbio.com

DNA Diagnostics
P.O. Box 4544
Crofton, MD 21114-4544
703-495-9090
www.DNAdiagnosticsinc.com

Dynal Biotech, Inc.
9099 North Deerbrook Trail
Brown Deer, WI 53223
800-558-4511
www.dynalbiotech.com

Eastman Kodak Co.
343 State Street
Rochester, NY 14652
800-225-5352
www.kodak.com

Exon-Intron, Inc.
Specialists in Biotech Education
P.O. Box 395
Loganville, PA 17342
800-407-6546
www.DNAtech.com

FOTODYNE, Inc.
950 Walnut Ridge Drive
Hartland, WI 53029
800-362-3686
www.fotodyne.com

GenHunter
624 Grassmere Park Drive
Suite 17
Nashville, TN 37211
800-311-8260
www.genhunter.com

Invitrogen Corporation
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
800-955-6288
www.invitrogen.com

ISCO, Inc.
P.O. Box 82531
Lincoln, NE 68505-0347
800-228-4250
http://ISCO.com

Kendro Laboratory Products
308 Ridgefield Court
Asheville, NC 28806
800-522-7746
www.sorvall.com

Kimble-Kontes
1022 Spruce Street
Vineland, NJ 08360
888-546-2531
www.kimble-kontes.com

Kirkegaard & Perry
Laboratories, Inc.
2 Cessna Court
Gaithersburg, MD 20879
800-638-3167
www.kpl.com

Lofstrand Laboratories, Ltd.
7961 Cessna Avenue
Gaithersburg, MD 20879
800-541-0362
www.lofstrand.com

Lumigen, Inc.
22900 W. Eight Mile Road
Southfield, MI 48034
248-351-5600
www.lumigen.com

Matrix Technologies
Corporation
22 Friars Drive
Hudson, NH 03051
800-345-0206
www.matrixtechcorp.com

Media Cybernetics, Inc.
8484 Georgia Avenue
Suite 200
Silver Spring, MD 20910
800-992-4256
www.mediacy.com

Millipore Corporation
290 Concord Road
Billerica, MA 01821
800-645-5476
www.millipore.com

Monomer Sciences, Inc.
Nature's Way
P.O. Box 520
New Market, AL 35761
www.monomer.com

Molecular Probes, Inc.
P.O. Box 22010
Eugene, OR 97402-0414
800-438-2209
www.probes.com

Nalge Nunc International
75 Panorama Creek Drive
Rochester, NY 14625
800-625-4327
www.nalgenunc.com

Perkin Elmer Life and Analytical
Sciences, Inc.
549 Albany Street
Boston, MA 02118
800-762-4000
www.perkinelmer.com

New England Biolabs
32 Tozer Road
Beverly, MA 01915
800-632-5227
www.neb.com

Nikon Instrument Group
1300 Walt Whitman Road
Melville, NY 11747
800-526-4566
www.nikonusa.com

Omni International
4257 Aiken Drive, Suite D
P.O. Box 861455
Warrenton, VA 20187
800-776-4431
www.omni-inc.com

Owl Separation Systems
55 Heritage Avenue
Portsmouth, NH 03801
800-242-5560
www.owlsci.com

Pierce Biotechnology, Inc.
P.O. Box 117
Rockford, IL 61105
800-874-3723
www.piercenet.com

Polaroid Corporation
575 Technology Square
Cambridge, MA 02139
800-225-1618
www.polaroid.com

Promega Corporation
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711
800-356-9526
www.promega.com

Qbiogene
2251 Rutherford Road
Carlsbad, CA 92008
800-697-1111
www.qbiogene.com

Roche Applied Science
9115 Hague Road
P.O. Box 50414
Indianapolis, IN 46250
800-262-1640
www.roche-applied-science.com

Rohm & Haas Co.
100 Independence Mall, West
Philadelphia, PA 19106
800-221-8992
www.rohmhaas.com

Schleicher & Schuell
Bioscience
10 Optical Avenue
Keene, NH 03431
800-245-4024
www.s-and-s.com

Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63160
800-521-8956
www.sigmaaldrich.com

Stratagene Cloning Systems
11011 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
800-424-5444
www.stratagene.com

Tri-Continent Scientific, Inc.
12555 Loma Rica Drive
Grass Valley, CA 95945
800-937-4738
www.tricontinent.com

VWR Scientific
200 Center Square Road
Bridgeport, NJ 08014
800-932-5000
www.vwrsp.com

Whatman, Inc.
9 Bridewell Place
Clifton, NJ 07014
800-631-7290
www.whatman.com

Worthington Biochemical
Corporation
730 Vassar Avenue
Lakewood, NJ 08701
800-445-9603
www.worthington-biochem.com

Zeiss, Inc.
One Zeiss Drive
Thornwood, NY 10594
800-233-2343
www.zeiss.com

附录 16　SI 词头

因　数	词头名称		符　号
	英文	中文	
10^{24}	yotta	尧[它]	Y
10^{21}	zetta	泽[它]	Z
10^{18}	exa	艾[可萨]	E
10^{15}	penta	拍[它]	P
10^{12}	tera	太[拉]	T
10^{9}	giga	吉[咖]	G
10^{6}	mega	兆	M
10^{3}	kilo	千	k
10^{2}	hecto	百	h
10^{1}	deka	十	da
10^{-1}	deci	分	d
10^{-2}	centi	厘	c
10^{-3}	milli	毫	m
10^{-6}	micro	微	μ
10^{-9}	nano	纳[诺]	n
10^{-12}	pico	皮[可]	p
10^{-15}	femto	飞[母托]	f
10^{-18}	atto	阿[托]	a
10^{-21}	zepto	仄[普托]	z
10^{-24}	yocto	幺[科托]	y

附录 17　通用缩写

A (adenine)	腺嘌呤
amol (attomole)	埃摩尔，10^{-18} mol
ARE (adenine/uracil-rich element)	富含腺嘌呤/尿嘧啶元件
BMP (bit map)	位图
C (cytosine)	胞嘧啶
cRNA [complementary (antisense) RNA]	互补（反义）RNA
cpRNA (chloroplast RNA)	叶绿体 RNA
ctRNA (countertranscript RNA)	反转录 RNA
DNA (deoxyribonucleic acid)	脱氧核糖核酸
dNTP (a cocktail of nucleotides containing equimolar amounts of dATP、dCTP、dGTP、dTTP)	含有等摩尔 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 的核苷混合物
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	乙二胺四乙酸
fg (femtogram)	飞克（10^{-15} g）
G (guanine)	鸟嘌呤
GIF (graphics interchange format)	图像可交换文件格式
h (hour)	小时
hnRNA (heterogeneous nuclear RNA)	核不均一 RNA
JPEG (joint photographic experts group)	（“联合图像专家组”创建的）图像文本格式名

μg (microgram)	微克 (10^{-6}g)
μl (microliter)	微升 (10^{-6}L)
min (minutes)	分钟
mol (mole)	摩尔
mRNA (messenger RNA)	信使 RNA
MSDS (material safety data sheet)	材料安全数据表
NaAc (sodium acetate)	乙酸钠
NTP (a cocktail of nucleotides containing equimolar amounts of ATP、CTP、GTP、UTP)	含有等摩尔 ATP、CTP、GTP、UTP 的核苷混合物
nt (nucleotide)	核苷
OD (optical density)	光密度
PCI [phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)]	苯酚 : 氯仿 : 异戊醇 (25 : 24 : 1)
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链反应
pg (picogram)	皮克
Pu [purine (adenine, guanine)]	嘌呤 (腺嘌呤, 鸟嘌呤)
Py [pyrimidine (cytosine, thymine, uracil)]	嘧啶 (胞嘧啶, 胸腺嘧啶, 尿嘧啶)
q. s. (quantum sufficiat, quantum sufficit, quantum satis)	足量
rDNA (recombinant DNA)	重组 DNA
RNA (ribonucleic acid)	核糖核酸
RNase (ribonuclease)	核糖核酸酶
RPA (ribonuclease protection assay)	核糖核酸酶保护试验
rRNA (ribosomal RNA)	核糖体核糖核酸
s, sec (second)	秒
SAM (*S*-adenosyl-methionine)	*S*-腺苷甲硫氨酸
T (thymine)	胸腺嘧啶
TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine)	3,3′,5,5′-四甲基对二氨基联苯
tRNA (transfer RNA)	转移核糖核酸
U (uracil)	尿嘧啶
1° (primary)	一级
2° (secondary)	二级
3° (tertiary)	三级

附录 18　商标引用

AccuTaq LA™是 Sigma-Aldrich 公司注册商标。

Amerlite®是 Rohm Hass 公司注册商标。

Amplifluor®是 Intergen 公司注册商标。

Ampligen®是 Hemispherx Biopharma 公司注册商标。

AmpliTaq®是 Roche Molecular Biosystems, Inc. 公司注册商标。

AmpliWax®是 Roche Molecular Biosystems, Inc. 公司注册商标。

Blast®是 National Library of Medicine 公司注册商标。

Centricon 是 Millipore 公司注册商标。

CDP Star®是 Appllied Biosystems 公司注册商标。

Corex® 是 Corning，Inc 公司注册商标。
Coomassie 是 Imperial Chemical Industries，Inc. 公司注册商标。
CSPD® 是 Appllied Biosystems 公司注册商标。
Cy3® 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Cy5® 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Deep Vent® 是 New England BioLabs 公司注册商标。
DNA Distick™ 是 Invitrogen Corporation 公司注册商标。
Dynabeads® 是 Dynal Biotech，ASA 公司注册商标。
ECL™ 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
E-Gel® 是 Invitrogen Corporation 公司注册商标。
Elutip-d® 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Eppendorf® 是 Eppendorf-NetherHinz GmbH 公司注册商标。
Expand™ 是 Roche Applied Science 公司注册商标。
Extractor® 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Ficoll® 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
FORMAzol® 是 Molecular Research Center，Inc. 公司注册商标。
Gel-Pro® 是 Media Cybernetics，Inc. 公司注册商标。
Gelstar® 是 FMC Corporation 公司注册商标。
GenBank® 是 United States Department of Health and Human Services 公司注册商标。
GeneAmp® 是 Roche Molecular Systems 公司注册商标。
Hybond® 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Hyperfilm™ 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Igepal® 是 ISP technologies，Inc. 公司注册商标。
JumpStar™ 是 Sigma Aldrich Corporation 公司注册商标。
Kimwipes® 是 Kimberly-Clark Corporation 公司注册商标。
Lab-Line™ 是 Lab-Line Instruments，Inc. 公司注册商标。
Lumiphos® 是 Lumigen，Inc 公司注册商标。
Minifold® 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Nalgene® 是 Nalge Nunc International Corporation 公司注册商标。
Nonidet P-40® 是 Shell International Petroleum Company Ltd. 公司注册商标。
Nytran® 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Optitran® 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Parafilm® 是 American Can Company 公司注册商标。
pBluescript® 是 Stratagene 公司注册商标。
pGEM® 是 the Promega Corporation 公司注册商标。
Plexiglass™ 是 Rohm and Haas Co. 公司注册商标。
Polaroid® 是 Polaroid Corporation 公司注册商标。
Polytron® 是 Kinematica AG Company 公司注册商标。
Posiblot® 是 Stratagene 公司注册商标。
Pronase® 是 Calbiochem-Novabiochem Corp. 公司注册商标。
PYREX® 是 Corning，Inc 公司注册商标。
RedTaq™ 是 Sigma-Aldrich Corporation 公司注册商标。
Riboprobe® 是 Promega Corporation 公司注册商标。
RNAquard® 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。

RNA*later*® 是 Ambion，Inc. 公司注册商标。
RNasin® 是 Promega Corporation 公司注册商标。
Rubbermaid 是 Newell Rubberr Corporation 公司注册商标。
SaranWrap™ 是 S. C. Johnson 公司注册商标。
SeaKem GTG® 是 Cambrex Bio Science 公司注册商标。
Sephadex™ 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Sepharose™ 是 Amersham Biosciences 公司注册商标。
Speed Vac® 是 Savant Instruments，Inc. 公司注册商标。
Sigmacote® 是 Sigma-Aldrich Company 公司注册商标。
Stratalinker® 是 Stratagene 公司注册商标。
Subtractor® 是 Invitrogen Corporation 公司注册商标。
SUPERase • In™ 是 Ambion，Inc. 公司注册商标。
Super Scripf™ 是 Invitrogen Corporation 公司注册商标。
SYBR® 是 Molecular Probes，Inc. 公司注册商标。
SYPRO® 是 Molecular Probes，Inc. 公司注册商标。
TAMRA™ 是 Perkin Elmer 公司注册商标。
Triton® 是 Union Carbide Chemical Plastics Co.，Inc. 公司注册商标。
TaqMan® 是 Applied Biosystems 公司注册商标。
TaqStarf™ 是 Clontech Laboratories，Inc. 公司注册商标。
Teflon® 是 E. I. DuPont de Nemours & Co.，Inc. 公司注册商标。
Tissue-Tek® 是 Sakura-Finetek 公司注册商标。
TRI Reagent® 是 Molecular Research Center，Inc. 公司注册商标。
TRIzol® 是 Molecular Research Center，Inc. 公司注册商标。
TurbBlotter™ 是 Schleicher & Schuell Bioscience 公司注册商标。
Tween® 是 ICI Americas，Inc. 公司注册商标。
Ultrafree® 是 Millipore Vorporation 公司注册商标。
Vent® 是 New England BioLabs 公司注册商标。
Whatman® 是 Whatman，Ltd. 公司注册商标。
Ziplot® 是 S. C. Johnson Son，Inc. 公司注册商标。

（附录部分，包慧中译；金由辛校）

术 语 表

abundance　丰度　细胞内某一种 RNA 或一类 RNA 分子所占比例的表述。某一特殊种类的 mRNA 在不同样品中的相对数量，通常用相对丰度表述。

accession number　收录号　GenBank 给核酸序列（基因组 DNA 或 cDNA）或氨基酸序列（蛋白质）指定的数字标识。该收录号相当于一个检索数据库时使用的电子分类卡片目录。

acetylation　乙酰化　在分子上导入一个乙酰基团（$—COCH_3$）。

adduct　加成化合物　一种化学加成反应的产物。

adenine　腺嘌呤　一种通常在 DNA 中与胸腺嘧啶配对，而在 RNA 中与尿嘧啶配对的嘌呤碱基。

adenosine　腺嘌呤核苷，腺苷　一种含有腺嘌呤的核苷。

affinity chromatography　亲和层析　一种根据生物活性或生物结构，对分子进行物质分离的方法。如利用 oligo（dT）与某些真核 RNA 的 poly（A）尾部的碱基配对，以及用镍柱捕获带有寡聚组蛋白的融合蛋白。

alkylation　烷基化　对分子增加含碳基团的修饰。核酸的烷基化修饰常是基因突变的成因。

allele　等位基因　一个基因所具有的两个或几个可替代形式中的一个形式。

***Alu* repeat sequence　*Alu* 重复序列**　数十万个序列中的一个，长度大约为 300bp，广泛存在于整个基因组中。这些重复序列因含有限制性核酸内切酶 *Alu* 的酶切位点（AGCT）而得名。

α-amanitin　α-鹅膏蕈碱，蝇蕈素　一种二环八肽毒素，来源于强毒蘑菇 *Amanita phalloides*。该真菌产物对真核 RNA 聚合酶有不同的抑制效率，其中对 RNA 聚合酶Ⅱ的抑制最强。

amber codon　琥珀密码子　即翻译终止密码子 UAG。

amino acids　氨基酸　蛋白质的组成单位。

ampliTaq　微生物 *Thermus aquaticus* 中天然存在的热稳定 DNA 聚合酶的重组表达产物。

anneal　退火　多聚核苷的碱基互补配对形成双链分子的过程。

antigen　抗原　可以引起抗体合成或引起免疫反应的任何分子或分子中的部分。

antiparallel　反平行　两条互补的多聚核苷酸相互配对的方式；两个相关分子的 5′端和 3′端相反，一链的 5′端与另一链的 3′端结合配对。双链 DNA（DNA∶DNA）、双链 RNA（RNA∶RNA）以及 DNA-RNA 杂合双链（DNA∶RNA）都是以反平行的方式进行碱基配对的。

antisense　RNA［也写作（－）RNA］**反义 RNA**　任何与天然产生的 mRNA 序列反向互补的 RNA 分子。反义 RNA 可在膜上或是原位与 mRNA 分子杂交，生成极为稳定的双链 RNA。

AOI（area of interest）**　关切区**　在一个图像中被定义的一组毗连的像素，它们可以排列成任意的多边形，用来与该图像中的其他区域相区别。

argonaute　一个蛋白质家族。是 RNA 诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）的组成成分之一。它们通过 RNA 干扰（RNAi）介导 mRNA 降解。

array　阵列　见微阵列（microarray）。

attenuation　衰减　某些原核操纵子调控转录终止的方法。

autoradiograph（也称作 autoradiogram）**放射自显影图** 把目标物紧贴在照相软片或感光乳剂上，就可以得到一个记录有目标物（或样本）放射空间分布的，被称作放射自显影图的相片。

autoradiography 放射自显影 在 X 射线片或其他照相感光乳剂上记录标记分子放射性衰变信号的过程。

autosomes 常染色体 除去性染色体之外的所有染色体。人类的第 1 对～第 22 对染色体为常染色体。

bacteriophage 噬菌体 一种感染细菌并以其为宿主进行繁殖的病毒，通常用于克隆。噬菌体中，λ 噬菌体及其衍生病毒被研究得最为广泛具体。

base pairing 碱基配对 即在两个核酸分子含氮碱基间形成氢键的过程。

β particle β 粒子 放射性衰变过程中，从原子核释放出的带有单个电荷的基本粒子。带一个负电荷的 β 粒子为一个电子，带一个正电荷的 β 粒子为一个正电子。

betaine 甜菜碱 PCR 的一种化学添加物，可以减少富含 GC 区域的二级结构形成，帮助 DNA 扩增。标准储备液浓度为 5mol/L。

bioinformatics 生物信息学 综合了计算机、信息技术以及生物工程学的手段，使用户可以对庞大的核酸与蛋白质序列信息进行分类和归档。

biotechnology 生物工程学（参见遗传工程） 利用微生物、植物和动物细胞，生产有价值的产品，如食物、药品及其他化合物。

biotin 生物素 一种小分子维生素，可用于标记核酸等多种目标，包括用非放射性化学发光和显色技术进行杂交等。

bit 比特，位 计算机所能识别的最小信息单位。一个像素由一个或多个计算机位表述。描述每个像素的位数大小，直接决定了可显示图像的彩色和灰度数值。

bit depth 比特数，位深 用于描述一个像素值所使用的位数，也称为像素深度（pixel depth）和每像素比特（bits per pixel，BPP）。

bit map 位图 用于表示一幅图像的二维阵列。该阵列的每一单元都包含有一个描述图像颜色样本的数值。

BLAST（basic local alignment search tool） 常用的著名生物信息学资源。研究者可在互联网上使用 BLAST 对 GenBank 内的核酸/蛋白质序列进行搜索查询。

BMP（bit map） 一种数字图形文件的格式。

BPP（bits per pixel） 描述图像的位深。二阶图像仅 1BPP，而真彩色为 24BPP。

brightness 亮度 即图像中白色所占的多少。图像越亮就包含更多的白点。随着亮度的增加，图像中的各种颜色都向白色转变。

buoyant density 浮力密度 在标准溶液里某物质漂浮能力的大小。如由于 RNA 和 DNA 的浮力密度不同，因此可在氯化铯或三氟乙酸铯中把它们分开。

CAAT box 位于真核基因转录起始位点上游大约 75bp 处的保守序列，是真核启动子的一部分。

cap 帽子 真核 mRNA 5′末端结构，由起始两个核苷间的倒接（5′5′）组成。细胞核内 mRNA 转录完毕，就有酶促反应，在核不均一 RNA（hnRNA）的 5′端进行修饰，形成 5′帽子结构。帽子结构又包括帽子 0（此结构仅限于某些病毒 mRNA）、帽子 1（含 1 个甲基基团，是最常见的形式）和帽子 2（含 2 个甲基基团，观察到的普遍性低于帽子 1）。

cDNA 见互补 DNA（complementary DNA）。

cesium chloride（CsCl） **氯化铯** 用于密度梯度分离核酸的高密度盐。CsCl 常用于沉淀 RNA，在其他应用中也被用于质粒 DNA 的纯化。

cesium trifluoroacetate（CsTFA） 三氟乙酸铯 用于密度梯度分离核酸的高密度盐。CsTFA 可以形成比 CsCl 更大的密度梯度，因此 RNA 可以在 CsTFA 中形成条带或被沉降下来。

chaotropic 离液的 生物学名词，离液裂解缓冲液破坏细胞和亚细胞膜结构，并接触性破坏酶的活性。

chemiluminiscence 化学发光 一种非放射性杂交检测技术。化学发光就是化学反应所造成的可见光。

chromatid 染色单体 有丝分裂中期的染色体中清晰可见的两个独立的亚单位之一。染色单体通常由中心粒偶联，到有丝分裂的后期分开。

chromatin 染色质 细胞间期，细胞核内基因组 DNA 和蛋白质构成的复合物。在有丝分裂过程中，染色质固缩成可辨识的染色体。

chromosome jumping 染色体跳跃 一种类似于染色体步行（chromosome walking）的技术。但是由于脉冲凝胶电泳纯化的 DNA 片段非常大（大于 100kb），出于亚克隆的目的从这样的 DNA 一端开始移动，与其说是“步行”不如称为“跳跃”来得更为恰当。参见染色体步行。

chromosome walking 染色体步行 系统地分离一系列包含有重叠 DNA 片段的克隆，这些 DNA 片段可综合成某一特异基因组区域。首先，用序列特异性的探针确认某个特殊位点。然后，一旦从文库中回收了这一克隆，染色体步行就不断地重复亚克隆和对文库的再杂交。分别使用前一次从文库中回收得到的克隆的 3′末端和 5′末端作为下一次杂交所用的探针。这样，凭借得到的该系列重叠的克隆，就能对特定基因座的内部、上游和下游进行基因座性质分析。这一手段可以用来朝向或背离目标基因座进行“步行”扫描。

cistron 顺反子 离散的 DNA 区域或特异序列。顺反子是一个以前的专用名词，现在常定义为基因。

clone（名词）克隆 一组遗传一致的细胞或分子。

clone（动词）克隆 即为了特性分析、储存或更进一步的扩增，对某特定的核酸序列或细胞进行一系列分离并扩增的操作。

clone Bank 克隆银行 一个旧有名词，即现在的 cDNA 文库和基因组文库。

coding strand 编码链 双链 DNA 中与产物 RNA 序列一致的那一条链（除胸腺嘧啶代替尿嘧啶外）。

codon 密码子 在 mRNA 编码区发现的三联核苷。核苷的确切顺序决定了新生肽段中氨基酸的种类和位置。标点符号（起始和终止）也是密码子特异的。

competitive PCR 竞争 PCR 一种非常灵敏的定量转录丰度的方法。在同一个反应管中，加入可与实验样本竞争引物和 dNTP 的 DNA 序列，通过改变 DNA 竞争物（又称 DNA 类似物）的量，就可以找到一个与目标 DNA 等量的类似物稀释浓度，进而可以极为精确地定量。

complementary DNA（cDNA） 互补 DNA（cDNA） 体外反转录酶以 RNA 为模板合成的 DNA。就特定实验的要求不同，可以是单链或双链的形式。就细胞生物学而言，合成的 cDNA 既是一个永久性的生化记录，也为该记录的扩增提供了可能。

compression 压缩 一种数学技术，可以将图形储存在较小的记忆体（memory）中。图形内部表述的冗余部分被确认并给以编码，这些冗余的数据就用此编码代替。

consensus sequence 共有序列 在对多个分子进行检查和序列比对之后得到的核苷酸或氨基酸类似序列；本质上就是几个类似分子的共性部分。如果发现的一致序列中有单个核苷酸或氨基酸残基的不同，通常这种序列的模糊性会用百分比特别指出（A_{90} 表示在这个位点出现 A 的比例是 90%），或是直接在序列中将这一置换列出（ATCG C/A TGTAT）。

conserved sequence 保守序列 在物种间没有差别或仅有微小差别的 DNA 序列。

constitutive gene expression 组成型基因表达 即 RNA 聚合酶与基因的启动子序列的结合不受其他因素调控。组成型表达的基因通常维持在低水平的基线表达，有时也被称为看家基因。

contrast 对比度 图像的锐利程度。对比度越高，则白/黑的差别以及彩色的跨度就越大。增加对比度，导致图像中所有颜色及灰度之间的差别更为明显。

countertranscript RNA（ctRNA） 反向转录 RNA 反义 RNA 的另一个称呼。通常在原核基因表达的文章中会讨论到 ctRNA。

Curie（Ci） 居里 放射性的基本度量单位。1Ci 等于 3.7×10^{10} Bq（即每秒衰变数）。

cycloheximide 放线菌酮 一种抑制真核细胞蛋白质合成的药物，对原核细胞的蛋白质合成没有影响。

cytidine 胞嘧啶核苷，胞苷 含有胞嘧啶碱基的核苷。

cytogenetics 细胞遗传学 这一遗传学分支主要研究染色体的结构和行为。

cytoplasm 细胞质 细胞内介于细胞膜与核膜之间的部分。

cytosine 胞嘧啶 一个通常在 DNA 中与鸟嘌呤配对的嘧啶碱基。

degenerate codon 简并密码子 编码同一氨基酸的两个或几个密码子中的一个。

denaturation（of nucleic acids） （核酸）**变性** DNA 或 RNA 从双链转变成单链的过程。这意味着一个双链分子解离成两个单链分子，或者是分子内的碱基配对消失。

deoxyribonucleic acid（DNA） **脱氧核糖核酸** DNA 聚合酶催化形成的脱氧核糖核苷单磷酸的多聚物。在体内由复制过程生成，在体外可由 PCR 等方法合成。

diethyl pyrocarbonate（DEPC） **二乙基焦碳酸酯** 用于清除核酸酶活性的化学试剂。DEPC 有致癌作用，需小心操作。由于大多数供应商都提供不含核酸酶的水和试剂，因此可以避免 DEPC 的使用。

differential display PCR（DDPCR） **差异显示 PCR** 是鉴定两个或多个 RNA 族群中特异转录表达序列的一种方法。DDPCR 建立在 PCR 技术基础之上。首先在 PCR 系统中加入大量较短的引物，以保证所有表达的 RNA 都以 cDNA 的形式得到扩增；再通过电泳比较各个样本的扩增产物。如果几个生物样本都出现了同一分子量的扩增产物，这说明它们都表达了某个转录本；如果基因的表达被诱导或阻遏，那么就只有一个泳道会出现条带。

differentiation 分化 指细胞发育过程中发生生化和结构变化，由此产生结构和功能特化的细胞。

dimethyl sulfoxide（DMSO） **二甲基亚砜** 在电泳前与乙二醛联用导致 RNA 变性的试剂。DMSO 也可用来降低 DNA 二联体的 T_m（melting temperature，解链温度），支持长距离的 PCR。

diploid 二倍体 与单倍体（每一型染色体出现 1 次）和三倍体（每一型染色体出现 3 次）相比，含有两套完整染色体的细胞称为二倍体（每一型染色体出现 2 次）。

directional cloning 定向克隆 通过用限制性内切酶在 cDNA 或基因组 DNA 两端引入不同的末端，将 DNA 分子单向插入载体的技术。

DNA polymerase Ⅰ DNA 聚合酶Ⅰ 一种原核酶，能够以 DNA 为模板合成 DNA。天然的 DNA 聚合酶Ⅰ又称全酶或 Kornberg 酶，具有 3 种截然不同的活性：5′→3′聚合酶活性；5′→3′核酸外切酶活性和 3′→5′核酸外切酶活性。见 Klenow 片段。

dot blot 斑点印迹 对样品中特定 RNA 或 DNA 序列定量的膜印迹技术。通过一台歧管真空抽滤，通常样品在滤膜上点样成斑点状［见狭缝印迹（slot blot）］。斑点印迹没有与电泳相关的定性组分。

downstream 下游 在参考点 3′方向的序列（向表达方向延伸的部分）。如起始密码子位于真核 mRNA 5′帽子结构的下游。

duplex 二联体 通过碱基互补配对形成的多核苷酸双链分子或双链部分。

electropherogram 电泳图谱 显示 DNA 测序反应结果的图谱。

electrophoresis 电泳 一种色谱技术，大分子（如蛋白质或核酸）在通过介质时，按各自所带电荷被分离。

electrophoretogram 电泳图 凝胶电泳照片，反映了电泳后大分子在凝胶中的空间分布。

ELISA 酶联免疫吸附测定法 见 enzyme-linked immunosorbent assay。

enhancer element 增强子元件 一种短的 DNA 调控序列，它能够增强某些真核启动子的效率，引起转录上调。增强子元件的增强作用，与它相对目标启动子的方向、距离无关。

enrichment 富集 任何可以提高一种或若干种 RNA 亚群在细胞合成的总 RNA 中所占比例的方法。如纯化 poly(A)⁺ RNA 就富集了 mRNA。其中一种富集方法，就是在细胞裂解之前超诱导一种或几种 RNA。如对休眠细胞加以血清刺激，即诱导（富集）了细胞重新进入细胞周期时表达的增殖特异性 RNA。

enzyme-linked immunosorbent assay 酶联免疫吸附测定法 通过酶促反应，测定抗体-抗原复合体的方法。

ethidium bromide（EtBr） **溴化乙锭** 一种可平面插入核酸（包括 DNA 和 RNA）的染料，在紫外线照射下发出橘红的荧光。因此，EtBr 染色的凝胶可拍照留待以后的查询。EtBr 的标准储备液浓度为 10mg/ml，标准染色浓度为 0.5～1μg/ml。

exon 外显子 真核基因提供的成熟 mRNA 分子的部分。外显子可以被翻译也可以不被翻译。

expressed sequence tag（EST） **表达序列标签** 选定 cDNA 克隆的部分序列。数不胜数的数据库收藏了大量可用于基因鉴定的序列数据。

file format 文件格式 根据图像的种类、压缩类型和中间色模式，把图像储存在盘上的方法，如 TIFF、BMP、JPEG 和 GIF。

formaldehyde 甲醛 常用的 RNA 变性剂。应在通风橱中小心操作。甲醛是一种致肝癌剂和致畸剂，怀孕女性应避免使用。

formamide 甲酰胺 常用的化学溶剂，用来降低双链二联体的解链温度（T_m）的变性剂。常添加在低于所需温度的杂交反应中以保持严谨度。在电泳前常和甲醛一起使用使 RNA 变性。甲酰胺是一种致癌剂和致畸剂，怀孕女性应避免使用。

fosmid f 因子的装配型质粒（cosmid）。一般质粒可携带的 DNA 插入片段上限为 10kb DNA，而结构与质粒类似的 cosmid 和 fosmid 则可以携带大小约 45～50kb 的 DNA。由于后者的体积庞大，单个细菌内仅可以获得 1 个 fosmid 并进行复制，因此就克隆载体而言质粒更受欢迎。

frame grabber 取帧器，帧捕获器 一种计算机硬件，插在计算机插槽后可以直接将摄像机内的图像导入图形分析软件。

functional genomics 功能基因组学 研究细胞内 RNA 的水平，以及外界改变时细胞如何调控 RNA 的水平（简而言之，就是研究基因的表达）。

gamma（γ）伽马因子 调节图像深色区域对比度的、非线性对数对比度校正因子。

gene 基因 遗传单位。一个基因就是一段编码指导多肽合成的染色体 DNA 序列。

genetic engineering（recombinant technology，rDNA，gene cloning，gene splicing） **遗传工程**（重组技术，重组 DNA，基因克隆，基因拼接） 将某一物种的基因或基因片段转入其他物种的技术。遗传工程现在已成长为一个完整而具有深远潜力的产业。见 biotechnology。

genome 基因组 细胞内染色体 DNA 的整体。某些操作中需要区分细胞核基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA。

genomic DNA 基因组 DNA 即染色体 DNA。线粒体基因组表示为 mtDNA，叶绿体基因组表示为 cpDNA。

genomics 基因组学 研究基因结构和组织的学科。基因组学与 DNA 测序数据密切相关。

genotype 基因型 存在于某一细胞或生物的基因及等位基因的总体。

GIF（graphics interchange format） **图像可交换文件格式** 一种基于位图的 256 色图像格式。公司商标、艺术线条及其他相关应用的数字图形通常以 GIF 格式储存。

glyoxal 乙二醛 试剂，电泳前常用作使 RNA 变性，常与 DMSO 联用。

gray level 灰度 在黑白图像中赋予单个像素表示亮度的数值。位深 8 位时灰度的数值范围为 0～255，相应地表示从黑到灰到白的渐变。

guanine 鸟嘌呤 和胞嘧啶配对的嘌呤碱基。

guanosine 鸟嘌呤核苷，鸟苷 含有鸟嘌呤碱基的核苷。

haploid 单倍体 具有一组完整染色体（在配子中，每一型染色体出现 1 次）的细胞。参见二倍体（diploid）和三倍体（triploid）。

hapten 半抗原 本身不是抗原，在与较大的抗原分子（通常为蛋白质）偶联后，可以具有抗原性质的一类小分子。

heterogeneous nuclear RNA（hnRNA） **核不均一 RNA** mRNA 前体；真核细胞 RNA 聚合酶Ⅱ转录的初始产物。

histones 组蛋白 辅助染色质组建成可识别染色体的 DNA 结合蛋白。组蛋白是所有真核基因中最保守的蛋白质之一。

Hogness box（TATA box） **Hogness 盒**（TATA 盒） 保守的富含 AT 的模体，位于真核基因转录起始

位点的上游 25bp 处，是 RNA 聚合酶识别真核启动子的一部分。

holoenzyme　全酶　完整的酶（相对于切割产物而言）。

housekeeping gene　看家基因　在所有细胞内持续表达（至少理论上是始终持续表达）的基因，其产物是维持细胞生存所必需的。由于它们的表达，似乎是恒定的，所以常用测定看家基因的转录表达来证明实验操作背景下，细胞内的基因表达没有发生整体变化。

hybridization　杂交　两个核酸分子间氢键的形成，它显示互补的程度。杂交的专一性直接与杂交过程中系统的严谨度相关。

hydrogen bonding　氢键结合　带有正电荷的氢原子与带有负电荷的原子（如氧、氮）之间高度定向的吸引作用。互补碱基在核酸杂交时以氢键形式结合。见碱基配对（base pairing）。

hyperpolymer　超多聚体　标记探针分子的总体，它们不仅与靶序列杂交，还与其他探针的重叠序列相互杂交，结果导致靶序列上标记分子拖尾的现象。当标记过程中发生了新生核酸链骨架断裂（如切口平移时）或者引物合成时骨架末端封闭失败（引物延伸实验时），就会发生这种情况。超多聚化造成了信号扩增，因此可以在放射自显影时缩短曝光时间，但这样会在分辨率上略有损失。

image　图像　图像分析软件所分析的对象。图像也可以指被扫描输入图像分析软件的艺术品、绘画或照片原件。

image analysis　图像分析　一种对目标数字成像、储存并自动对图像中的不同目标（如凝胶上的电泳条带）进行参数（如分子量、质量、相对丰度、光密度等）测定的电子手段。

image class　图像类　图像的种类，由图像的位深决定。

inosine（I）　**次黄**（嘌呤核）**苷，肌苷**　含有次黄嘌呤碱基的核苷。有时次黄嘌呤核苷被用于合成“简并”或“猜测体”（guess-mer）寡核苷酸引物。

in silico　在计算机　通过计算机得到的。如用生物信息学软件预测转录起始位点。

intron　内含子　一个基因中打断编码序列（外显子）出现的 DNA 序列。内含子会被转录并出现在核不均一 RNA（hnRNA）中，在随后的 RNA 成熟过程中会被系统性切除。

ionizing radiation　电离辐射　从原子或分子中释放出电子并导致离子生成的任何辐射。电离辐射包括 α、β 和 γ 辐射三种。

isoprenylation　异戊二烯化　脂质基团和半胱氨酸残基之间的连接，是一种蛋白质翻译后修饰。

isotope　同位素　有相同原子序数和不同原子量的原子。

JPEG（joint photographic experts group）　**联合图像专家组**　一种广为运用的把彩色图像和照片数字化的电子压缩方法。

Klenow fragment（Klenow enzyme）　**Klenow 片段**（Klenow 酶）　大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段，用枯草杆菌蛋白酶消化 DNA 聚合酶 I 制备，也可以用克隆方法制备。Klenow 片段具有 5′→3′聚合酶活性和 3′→5′核酸外切酶活性，而没有全酶具有的 5′→3′核酸外切酶活性，见 DNA 聚合酶 I。

leader sequence　前导序列　成熟 mRNA 中位于起始密码子 5′端不被翻译的部分。

library　文库　包含有研究目标序列的、可以部分或全部代表某个特定生物材料内基因组 DNA 或 cDNA 复杂性的克隆集合。文库的构建方式，是在恰当的载体内插入 cDNA 或基因组 DNA 序列。可以用核酸杂交来筛选和回收目的克隆。如果构建文库使用的是表达载体，那么也可以用抗体识别来进行筛选。

ligase　连接酶　能把核酸分子连接起来的酶。可以把连接酶看作“分子黏胶”（如 DNA 连接酶），把功能与之相反的限制性核酸内切酶看作“分子剪刀”。

ligase chain reaction（LCR）　**连接酶链反应**　一种 DNA 扩增技术，常用来鉴定点突变。尽管 PCR 扩增的效率更高，LCR 的鉴别能力则更胜一筹；用 LCR 扩增产物可以兼顾扩增效率和有效识别碱基细微改变这两个需求。

locus（复数是 loci）　**基因座**　某个基因及其等位基因在染色体上的确切定位。

marker　标记　指在实验中任何目标等位基因的泛称。此外 marker 也表示为分子量标准。

meiosis　减数分裂　产生单倍体配子（性细胞）的细胞分裂过程。

melting temperature 解链温度 见 T_m。

Mendel（Father Gregor Mendel） **孟德尔**（格里哥·孟德尔神父） 于1865年首次提出基因概念的天主教牧师，公认的经典遗传学之父，以孟德尔遗传法则闻名。

messenger RNA（mRNA） **信使 RNA** RNA 聚合酶Ⅱ转录合成的成熟产物。在真核细胞中，mRNA 由 hnRNA 加工而来，在和蛋白质翻译机器结合后，能够指导合成其编码的多肽。

metabolomics 代谢组学 鉴定样品或者动物、植物、酵母和微生物的单个细胞中所含的低分子量化合物的种类、数目和数量的科学。代谢组学（和最近定义的代谢组学）研究使用的方法包括核磁共振（NMR）、气相色谱、液相色谱、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（2D-PAGE）和质谱。

metabonomics 代谢组学 特指人和其他高等动物中的代谢物组学。

methylmercuric hydroxide（methyl mercury） **甲基汞氢氧化物**（甲基汞） 在电泳或其他层析前，用来使 RNA 变性的剧毒试剂。在有其他选择的情况下，应尽量避免使用甲基汞。

microarray 微阵列 有上万个不同 DNA 片段印迹的玻璃片或尼龙膜，可对基因表达进行高通量分析。

mismatch 错配 双链分子中有一个或多个核苷酸不能碱基配对。因此为了容忍错配，退火温度应适当低于解链温度（T_m）；在解链温度时只有完全匹配的双链分子是稳定的。错配发生的位置及其周边序列给 PCR 的引物退火步骤带来很多变数。

mitosis 有丝分裂 体细胞的细胞分裂。有丝分裂是从一个母细胞产生遗传一致的二倍体拷贝（子细胞）的过程。

monocistronic 单顺反子的 即仅编码一个肽段的 mRNA 分子。

MOPS 3-(*N*-吗啉代)-丙磺酸 RNA 凝胶电泳缓冲系统内的关键组分，与甲醛联用。10×MOPS＝200mmol/L MOPS，pH 7.0；50mmol/L NaAc，10mmol/L Na_2-EDTA，pH 8.0。

MSDS（material safety data sheet） **材料安全数据表** 描述某物质物理性质和化学性质的文件，其中还包括对该物质正确的操作、储存、防泄漏和销毁方法，以及不慎暴露和摄取后所需的毒性数据和急救信息。MSDS 应妥善收藏在实验室随时可取的地方。

multiplex PCR 多元 PCR 在一个 PCR 反应管中同时扩增两个（以上）靶序列的操作。

normalization 标准化 为了使一系列滤膜或一张滤膜上的样本有可比性所进行的操作。

Northern analysis（Northern blotting） **Northern 分析**（Northern 印迹） 把经过琼脂糖凝胶电泳分离的 RNA 转移到滤纸并固定杂交的技术。Northern 印迹能对目的基因的表达进行定性及定量分析。

nuclear runoff assay 核逃逸实验 一种对细胞核内转录进程中产生的新生 RNA 进行标记的方法。目的 RNA 的转录速率可通过检测标记掺入的程度测定。与稳态 RNA（steady-state RNA）比较。

nuclease protection assay 核酸酶保护实验 对转录本丰度进行定位和定量的方法。大体步骤如下：探针和目的 RNA 在溶液中杂交；随后加入核酸酶完全或部分消化其中不能参与形成双链的分子，相对而言，被锁定的双链核酸分子在这个过程中较为安全；最后通过电泳或沉淀其中未降解的 RNA：RNA 或 RNA：DNA 进行定量分析。

nucleoside 核苷 一个连有含氮碱基（腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶）的五碳糖（核糖或脱氧核糖）。

nucleotide 核苷酸 含有一个五碳糖（核糖或脱氧核糖）、一个含氮碱基（腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶）和一个磷酸基团的分子。核苷酸是组成 DNA 和 RNA 的构件。

nuclide 核素 有相同原子序数和不同原子量的原子。

ochre codon 赭石密码子 即 UAA 终止密码子。

oligonucleotide 寡核苷酸 人工合成的短片段单链 DNA 分子，可用作核酸探针或引物分子。寡核苷酸也可以指 RNA 短片段。

opal codon 乳白密码子 即 UGA 终止密码子。

ortholog 直向同源基因 在某一物种及其他物种内发挥同样功能的基因。对直向同源基因的鉴定在某

种程度上揭示了这些物种间的进化亲缘关系。

palindromic sequence　回文序列　一小段双链 DNA 序列，其两条子链的 5′→3′序列相同。

PCI　实验室标准符号。代表苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）的混合物。

PCR　见聚合酶链反应。

pentose　戊糖，五碳糖　核糖或脱氧核糖，戊糖是核苷酸的组分。

pharmacogenomics　药物遗传学　该学科侧重研究基因组各个部分的相互作用以及病人对药物的反应。药物基因组学这个术语比药物遗传学使用得更为广泛。后者侧重研究个别基因对药物的反应。药物基因组学关注为个别人创立的药物与其细胞途径之间的相互作用。

parmacokinitics　药物动力学　研究体内特定时段内药物的吸收、加工以及清除的过程。

phosphate-buffered saline（PBS）　**磷酸盐缓冲生理盐水**　一种常用于洗涤单细胞层上残留培养液的等渗盐溶液。5×PBS(每升)=40g NaCl，1.0g KCl，5.75g Na_2HPO_4，1g KH_2PO_4；高压灭菌；使用前用灭菌水在无菌条件下稀释至 1×。

phosphorimaging　磷酸化成像　用以测定放射性衰减和电子分析的过程。与 X 射线片相比，磷酸化成像仪能提供更多的线性应答。磷酸化成像仪还能测定化学发光产生的发射光。

photodocumentation　光文件（记录）　一种在电泳或者用标记探针杂交后立即保存凝胶图像的方法。支持光文件（记录）的媒体包括一次性成像照片、X 射线片、热敏纸（thermal paper）以及数字储存。见图像分析（image analysis）。

photon　光子　一种没有质量但是能转移电磁能量的粒子。

pixel　像素　照片元素；数字成像的合成单元。一个图像被分成水平的栅格或列阵，通称为位图。每一个像素分配一个 x 和 y 坐标，描述它在整个图像中的贡献。

plasmid　质粒　一种共价键封闭的环状双链 DNA 分子。它在原核细胞中能自动复制（真核细胞质粒也已发展起来）。质粒能接受通常小于 10kb 的外源 DNA 嵌入，并且常常含有各种供选择的标记及一些辅助序列用来鉴定嵌入的 DNA。

poly(A)$^+$ tail　poly(A)$^+$ 尾　由核内的聚腺苷酸多聚酶催化，在 mRNA3′端加上的一小段腺苷残基。这种 poly(A)$^+$ 尾的添加包括初始转录物 3′端的剪切和随后的聚腺苷酸化。

polyadenylation signal　聚腺苷酸化信号　一个高度保守的 6 碱基模体（AAUAAA），它提高聚腺苷酸化的效率。真核 mRNA 分子 3′端腺苷酸聚合前的剪接过程受到（至少是部分受到）聚腺苷酸化信号的控制。在天然转录物上，AAUAAA 功能性地与下游富含 GU 和 U 的区域连接。

polycistronic　多顺反子　该术语是指含有一种以上多肽编码区的 mRNA。

polymerase chain reaction（PCR）　**聚合酶链反应**　这是一种由引物介导，扩增微量特异基因组或 cDNA 序列系统的酶反应过程。在过去 10 年中，这种技术已经使分子生物学发生了革命性变化。该技术具有非常灵敏的优点，并且可以迅速完成。使用这一技术，一个研究人员能从极不均一的样品库中分离并扩增到目标序列。

polymorphism　多态性　从属于变化的遗传特征。

polysome　多核糖体　一种同时被几个核糖体翻译着的 mRNA。

post-transcriptional regulation　转录后调控　所有发生在转录后的事件，它影响到此后任何与该基因最终表达有关的步骤。通常指转录终止到翻译机器装配前的所有事件。

post-translational regulation　翻译后调控　发生在初始多肽合成以后的任何事件，它影响到此后任何与该基因最终表达有关的步骤。通常指多肽修饰的效率，包括但不限于肽的糖基化、甲基化和羟基化等。

precursor RNA　RNA 前体　参见核不均一 RNA（hnRNA）或 mRNA 前体（pre-mRNA）。一种未经剪切的 RNA 分子，转录的初始产物。

pribnow box　普里布诺盒　即共有序列 TATAATG，原核细胞基因转录启动子的一部分。位于细菌基因转录起始位点上游约 10bp 处。

primer　引物　一种短的核酸小分子，根据与互补序列碱基配对的原理设计，具有一自由的 3′-OH，

可进行多种依赖引物扩展的反应。

probe 探针 通常是标记的核酸（DNA 或 RNA）分子。常常用它与文库中的互补序列或核酸存在的复杂的目标序列进行杂交，如 Northern 分析、Southern 分析或核酸酶保护实验等。

processivity 延伸性 一种酶（如 DNA 聚合酶）从 DNA 模板解离下来之前，结合在其底物上有效产生长产物（互补链）的能力。

promoter 启动子 在转录开始时，RNA 聚合酶和其他起始蛋白质结合的特殊位点的一段 DNA 序列。

proteome 蛋白质组 细胞在特定时间产生所有蛋白质的集合，典型的蛋白质组图谱是通过双向（2D）电泳和其他识别、定量及鉴定翻译产物的技术来制作和评估的。

proteomics 蛋白质组学 研究蛋白质的表达；特别是研究在特定生化条件下，一种细胞的蛋白质组分以及不同类别蛋白质在应答天然和人为刺激时是如何变化的。这个方法可以很方便地同时对多种蛋白质的功能特征进行研究。蛋白质组学构建了一套系统的研究方法，用于研究正常和病态细胞内蛋白质的功能和具基因组功能的丰度间的相关性。

purine 嘌呤 腺嘌呤和鸟嘌呤的化学结构上的母体碱基。

pyrimidine 嘧啶 胞嘧啶和尿嘧啶的化学结构上的母体碱基。

quinone 苯醌，醌 苯酚的氧化产物。由于醌能与核酸交联并断裂磷酸二酯键，在 RNA 制备过程中醌会影响 RNA 的质量。制备 RNA 时应重蒸和使用新鲜的苯酚以避免醌的影响。

q. s. 拉丁文（quantum satis）的缩写。含意是“足量”。在实验方案或程序中，它的含意是研究者要加足够的水到反应管中以达到特定的终体积。

RACE（rapid amplification of cDNA ends） **cDNA 末端快速扩增** 这种极其有用的技术有两种主要形式：5′RACE 和 3′RACE。它们分别克隆转录体的 5′末端和 3′末端。

radiochemical 放射性化学试剂 一种含有一个或多个放射性原子的化学试剂。

radiolysis 辐射裂解 当用比放射性非常高的放射性同位素标记时，DNA 或 RNA 探针发生的物理断裂。其裂解程度与探针标记的时间成函数关系。

radionuclide 放射性核素 一种自动衰变，并由此产生放射性的不稳定同位素的化学元素。

real-time PCR 实时 PCR 一种实时测量每一轮 PCR 累积的产物，而不是测量反应结束后终产物的方法。普遍认为这种方法是一种重要的定量 PCR 实验法。

renaturaton（also reannealing） **复性**（亦称重退火） 变性后互补的 DNA 或 RNA 链重新结合。

restriction endonuclease 限制性内切酶 一种 DNA 修饰酶，它可以在预期的位点切断双链 DNA 分子。这种酶被认为是一种“分子剪刀”。它一般在底物 DNA 回文的 4 个、6 个或 8 个碱基序列处切断磷酸二酯键。

retrovirus 反转录病毒 一种以 RNA 为基因组的病毒。它通过反转录将遗传物质变为双链 DNA 进行繁殖。

reverse transcriptase（RT） **反转录酶** 亦称依赖 RNA 的 DNA 聚合酶。是一种反转录病毒酶。这种酶以 RNA 为模板合成互补 DNA（cDNA）分子。现在有许多类型的反转录酶可以使用，包括常用的 AMV（来源：鸟类成髓细胞瘤病毒）和 MMLV（来源：莫洛尼鼠白血病病毒）等各种反转录酶。近期，还有许多没有 RNase H 活性的反转录酶可以用来合成特定的 cDNA。有些热稳定的反转录酶可以用于 PCR 实验。如发现嗜热真细菌（*Thermus thermophilus*）中含有一种在高温下依赖 Mn^{2+} 的反转录酶，它已成功地在试管中用于反转录聚合酶链反应（RT-PCR）。

ribonuclease（RNase） **核糖核酸酶** 一类很难灭活的酶家族。它们能迅速降解 RNA 分子。因此，一切涉及 RNA 操作的过程中都必须注意控制这种酶的活性。

ribonuclease A（RNase A） **核糖核酸酶 A** 一种专一的单链核糖核酸内切酶。它水解 RNA 分子中嘧啶核苷酸（Py/pN）3′端的磷酸二酯键，得到 3′-磷酸嘧啶核苷酸。

ribonuclease H（RNase H） **核糖核酸酶 H** 一种直接水解 RNA：DNA 杂合链中 RNA 链的酶。

ribonuclease T_1（RNase T_1） **核糖核酸酶 T_1** 一种专一的单链核糖核酸内切酶。这种酶专一水解 RNA

分子中鸟苷酸（GpN）3′端的磷酸二酯键，与核糖核酸酶 A 类似，生成带 3′-磷酸的寡核苷酸。

ribonucleic acid（RNA） **核糖核酸** 由 RNA 聚合酶合成的核糖核苷酸的多聚体。RNA 是转录产物。

ribosomal RNA（rRNA） **核糖体 RNA** 细胞中 RNA 的主要组成部分。rRNA 含量丰富，可以用来鉴定样品的完整性、质量以及可能的功用。因为它的组成比较简单，也可以在 RNA 电泳中作为分子量的标准参照物。

ribotyping **核糖核酸分类** 以限制酶切片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）为依据的一种技术。根据有机体 rRNA 基因结构特异性的差异来鉴定细胞和微生物。

ribozyme **核酶** 具有酶催化活性的 RNA 分子。

RISC（RNA-induced silencing complex） **RNA 诱导沉默复合物** 一种含核糖核酸内切酶的复合物，它通过裂解专一的信使 RNA（mRNA）分子而介导 RNA 干扰。

RLM-RACE（RNA ligase-mediated RACE） **RNA 连接酶介导的 RACE** 是快速扩增 cDNA 末端的一种形式。一寡核糖核苷酸片段连接到全长的 mRNA 分子上，然后反转录为 cDNA。这种方法有一个优点，就是它仅产生一种精确 5′端转录体的克隆。

RNAi **RNA 干扰** 转录后基因沉默；降解 mRNA 分子，因而抑制其蛋白质的翻译。

RNA polymerse **RNA 聚合酶** 以 DNA 为模板，通过转录过程合成 RNA 分子的酶。

S1 nuclease **S1 核酸酶** 专一水解杂交双链中单链区的酶，它需要锌离子、酸性 pH，尚不知它对核苷酸序列有无选择性。

SAGE（serial analysis of gene expression） **基因表达系列分析** 通过已连接在一起的 cDNA 小片段序列的测定，评估特定实验条件下多个基因转录活性的生物信息学工具。

saline sodium citrate（SSC） **柠檬酸钠生理盐水** 经常用于核酸杂交实验的盐溶液。它也是各种杂交实验用的缓冲液以及杂交后的洗涤液的主要组分。20×SSC＝3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，调 pH 至 7.0。

saline sodium phosphate-EDTA（SSPE） **磷酸钠-EDTA 生理盐水** 经常用于核酸杂交实验的盐溶液。它也是各种杂交缓冲液以及杂交后的滤膜洗涤液的主要组分。这种缓冲液中，磷酸盐与核酸的磷酸二酯相似，因此在 Northern 杂交和 Southern 杂交的膜上可以增强封闭、降低背景和提供较高的信噪比。20×SSPE＝3mol/L NaCl，0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$，0.02mol/L Na_2-EDTA，调 pH 至 7.4，灭菌。

sense RNA[(＋)RNA] **正义 RNA** 与天然 mRNA 有完全相同核苷酸序列的 RNA。反义 RNA 可以与 mRNA 在滤膜上或原位进行杂交，正义 RNA 仅在 Southern 分析中作为探针。此外，正义 RNA 一般用于评估非专一性杂交程度的负对照实验。

Sevag **色珐葛** 氯仿：异戊醇（24∶1）混合物的一个旧名称，参见 Sevag M G，et al. *J Biol Chem*，1938，124：425-436。

slot blot **狭缝印迹** 对样品中特定 RNA 或 DNA 序列定量的膜印迹技术。通过一台歧管真空抽滤，通常样品在滤膜上点样成条带形［见斑点印迹（dot blot）］。狭缝印迹没有与电泳相关的定性组分。

sodium dodecyl sulfate（SDS） **十二烷基硫酸钠** 一般用于破碎生物膜并抑制 RNase 活性的离子去垢剂。

Southern analysis **Southern 分析**（也称 Southern 印迹） 将琼脂糖凝胶电泳上分离的 DNA 转移到滤膜上，然后固定和杂交的技术。从 Southern 分析获得的信息可用来定性或定量评估特殊基因或其他位点的组织。

Spatial resolution **空间分辨率** 用双向（长和宽）像素网格定义的图像属性。

specific activity **比放射性** 每单位质量放射性物质的放射活性。最常用的表示方法为居里/毫摩尔（Ci/mmol）。

SSC 参见柠檬酸钠生理盐水。

SSPE 参见磷酸钠 EDTA 生理盐水。

steady-state RNA **稳态 RNA** 细胞或细胞质内最后积累的 RNA。例如，一种特定 mRNA 稳态量的测

定并不需要与它的转录速率联系。与核逃逸实验（nuclear runoff assay）比较。

Stoffel fragment（AmpliTaq DNA polymerase）**Stoffel 片段** 一种热稳定的重组 DNA 聚合酶。它比全长 AmpliTaq 聚合酶少 289 个氨基酸，而且更加对热稳定。其酶活性对镁离子浓度需要的范围更宽，并且缺少 5′→3′核酸外切酶活性。它通常被用于 PCR。

stringency 严谨性 对双链核酸解聚为单链核酸可能性的估量。它也可以评估单链核酸分子与其他分子间有较高程度或较低程度互补的可能性。严谨性条件高，有利于高度互补核酸之间的稳定杂交。严谨性条件低，则有利于非特异性杂交比例的增加。

structural gene 结构基因 与核糖体 RNA（rRNA）和转移核糖核酸（tRNA）相反，编码信使 RNA（mRNA）的基因称为结构基因。结构基因通常由独特的或适度重复基因构成，如 C_0t 动力学所展示的那样。

SYBR Green, SYBR Gold SYBR 绿，SYBR 金 是用来染色核酸的染料家族的新成员。一般在二甲基亚砜（DMSO）中配制成 10000×的储备液。用 Tris 缓冲液将 SYBR 染料稀释为使用浓度。例如，1×Tris-乙酸盐-EDTA（TAE）。与溴化乙锭相比，使用 SYBR 染料的优点是极大地减少了背景荧光，灵敏度更高，降低了致突变性。SYBR 绿和 SYBR 金用于染 DNA，而 SYBR 绿Ⅱ用于染 RNA。

systems biology 系统生物学 整合不同种类的生物学信息（DNA、RNA 和蛋白质），以帮助理解各类生物大分子各组分间的相互关系，以及它们如何影响细胞和整个有机体的学科。

TAE buffer TAE 缓冲液 参见 Tris-乙酸盐-EDTA 缓冲液。

TAP（tobacco acid pyrophosphatase）**烟草酸性焦磷酸酶** 这种酶可以除去真核细胞 mRNA 的 5′端帽式结构。该酶广泛应用于 RNA 连接酶介导的 cDNA 末端快速扩增（RLM-RACE）。

***Taq* DNA polymerase *Taq* DNA 聚合酶** 一种从耐热菌（*Thermus aquaticus*）分离出来的耐热 DNA 聚合酶。*Taq* 聚合酶是几种能用于进行聚合酶链反应（PCR）的聚合酶中的一种。

target 靶序列 与一核酸探针序列互补的单链 DNA 或 RNA 序列，称为靶序列。这种靶序列可以固定在一种固相载体上，也可以在溶液中进行杂交。

TBE buffer TBE 缓冲液 参见 Tris-硼酸盐-EDTA 缓冲液。

TEMED（*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylene diamine）***N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺** 这种季铵在制备聚丙烯酰胺凝胶时用作丙烯酰胺单体聚合的催化剂。

template 模板 合成另一种大分子的大分子信息蓝图。复制、转录以及聚合酶链反应（PCR）等所有聚合反应都需要模板。它可以指导新生链中核苷酸的精确序列。缺少模板，引物扩增类的反应则不能进行。

thermal cycler 热循环仪 完成聚合酶链反应（PCR）的仪器。

thymidine 胸腺嘧啶核苷 含有胸腺嘧啶碱基的一种核苷。

thymine 胸腺嘧啶 通常与腺嘌呤配对的嘧啶碱基。

TIFF（tagged image file format）**目标图像文本格式** 用于储存图像的软件文本。

T_m 解链温度 在此温度下，50%的双链解聚为单链。为了促进双链的形成，杂交实验一般在低于双链的 T_m 的条件下进行。温度越低，形成双链的可能性就越大，当然，包括错配的可能性也越大。

trailer sequence 尾部序列 位于 mRNA3′端的不翻译序列。在 poly(A)$^+$ mRNA 中，尾部序列位于编码区和 poly(A) 尾巴之间。

transcription 转录 RNA 聚合酶以 DNA 为模板合成 RNA 分子的过程。

transcription elongation 转录延伸 RNA 合成三步曲的第二步。其特征为在新生链的 3′端以共价键的形式加上核苷酸。当聚合酶沿模板移动时，新合成的 RNA 链被 DNA 置换，DNA 模板经退火而恢复成双链。

transcription initiation 转录起始 RNA 合成三步曲的第一步。转录起始步骤从 RNA 聚合酶与双链 DNA 结合而开始，接着模板局部展开呈单链状。

transcription termination 转录终止 RNA 合成三步曲的第三步，也是转录的最后一步。这一步涉及聚合酶识别一个部位，超过这一部位，RNA 链上不再添加核苷酸。RNA 链加上最后一个核苷酸后，RNA 链

和 RNA 聚合酶都从 DNA 模板上解离下来。

transcriptome　转录组　特定细胞在特定环境下产生的一整套信使 RNA（mRNA）分子。

transcriptomics　转录组学　对一组织所有转录物的全面分析，以及当内部条件变化后这些 mRNA 表达的变化。

transfection　转染　将核酸导入真核细胞，常用的是化学方法。转染可分为暂时性的，即细胞最终恢复到转染前的表型；或者是稳定型的，即转染的 DNA 整合到寄主细胞的染色体中。真核细胞的稳定转染是很少见的。

transfer RNA（tRNA）　**转移核糖核酸**　细胞内含量比较丰富的 RNA。在蛋白质合成中，它携带氨基酸到核糖体的氨酰化 tRNA 位（即 A 位）。细胞内 tRNA 的总含量偶尔被作为细胞转录水平的指标进行测定，作为看家转录指标，以显示特殊的实验操作是否引起细胞全部转录水平的改变。

translation　翻译　以 RNA 模板中的编码信息合成多肽的过程。随着 mRNA 被核糖体解读，翻译发生了。

translation elongation　翻译延伸　蛋白质合成三步曲的第二步。延伸这一步包括蛋白质中所有肽键的合成，即活化的氨基酸逐个加到新生肽链的羧基端。

translation initiation　翻译起始　蛋白质合成三步曲的第一步。起始涉及 mRNA 与核糖体的结合、这一事件前的所有生化反应、氨基酸间第一个肽键的生成，该氨基酸处于新生肽链的 N 端。

translation termination　翻译终止　蛋白质合成三步曲的第三步，也是最后一步。这一步涉及完成的多肽链和指导合成的 mRNA 二者从核糖体上释放出来。

triploid　三倍体　有三套完整染色体（每一型染色体出现 3 次）。参见二倍体（diploid）和单倍体（haploid）。

Tris-acetate-EDTA buffer（TAE buffer）　**Tris-乙酸盐-EDTA 缓冲液**　常用的 DNA 电泳缓冲液。50× TAE（每升）=242g Tris 碱；100ml 0.5mol·L Na_2-EDTA，pH8.0；57.1ml 冰醋酸；灭菌。使用浓度是 1× TAE。

Tris-borate-EDTA buffer（TBE buffer）　**Tris-硼酸盐-EDTA 缓冲液**　常用的 DNA 电泳缓冲液。特别适用于低分子量的 DNA。20×TBE(每升)=121g Tris 碱；61.7g 硼酸钠；7.44g Na_2-EDTA。使用浓度是 1× TBE。

tRNA　参见转移核糖核酸（transfer RNA）。

***Tth* DNA polymerase**　***Tth* DNA 聚合酶**（亦称 *rTth*）　是重组的 *Thermus thermophilus* DNA 聚合酶。这种酶也表现依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活性（即反转录酶活性），需要锰离子。它可以在高温下合成 cDNA，接着可以进行标准的依赖镁离子的 PCR 扩增反应。

upstream　上游　某一指定位点的 5′方向（与表达方向相反的）的序列，如真核细胞 mRNA5′端帽式结构位于起始密码子的上游。

uracil　尿嘧啶　通常与腺嘌呤配对的嘧啶碱基。

uridine　尿嘧啶核，尿苷　一种含有尿嘧啶的核苷。

vanadyl ribonucleoside complexes（VDR 或 VRC）　**氧钒核糖核苷复合物**　一种 RNase 抑制剂。经常加入温和的 RNA 裂解缓冲液中用以抑制 RNase 活性。这种复合物发挥 RNA 类似物的功能。

vector　载体　一种核酸分子，如质粒、噬菌体或类噬菌体质粒等，其中连接有另一个核酸分子（即所谓插入序列或外源 DNA）含有一段序列的载体可以在适当的寄主细胞内与其携带的 DNA 一起增殖。

Western analysis（Western blotting）　**Western 分析**（Western 印迹）　将聚丙烯酰胺凝胶电泳所得的蛋白质图谱转移到滤膜上进行抗原-抗体识别鉴定的一种技术。Western 分析得到的信息用来定性和定量评估特定多肽的状态。

xenobiotic　异生素，生物异源物　一种细胞或有机体内没有的化学制品。

（刘望夷　金言译；包慧中　金由辛校）

索　引

A

吖啶橙 113，123
癌阵列 327
矮牵牛 333
安全灯 184
暗盒 186

B

靶 154
斑点印迹 98
胞嘧啶 3
宝丽来 DS-34 手提式照相机 130
曝光时间 185
背景校正 140
苯酚 33，41，42，359，367
编号 346
编码链 11
编码区 19
丙烯酰胺 383
玻璃器皿 29
补骨脂素 189

C

参比 RNA 331
差减-校正 PCR 298，300
差减杂交 296
差减杂交 296，376
差异显示 PCR 307，308，317
超磁珠 80
巢式 PCR 261
巢式引物 300
重氮苄氧甲基纤维素 143
初级扩增 283
磁珠 80
次黄嘌呤-鸟苷磷酸核糖基转移酶 271
次级扩增 285
错配 175

D

代谢组 346
代谢组学 346
单管 RT-PCR 244
单链构象多态性 321
蛋白酶 K 34
蛋白质微阵列 349
蛋白质组 346
蛋白质组学 346
等密度离心 47
地高辛 160，190
第一链 cDNA 162
点饱和 102
电压 385
电泳 104
电泳槽 124，125，386
电泳缓冲液 125
电泳仪 124
电源 125
电转印迹法 146
定影 187
杜恩斯匀浆器 64
短发夹 RNA 335
短干扰 RNA 335
对比度 138
对称性 PCR 240
多孔面板 99
“多重” 273
“多重” PCR 249

E

2,5-二苯基噁唑 186
二氢叶酸还原酶 271
二巯基苏糖醇 28
1,2-二氧环己烷衍生物 191
二乙基焦碳酸酯 30

F

翻译 15
反式斑点印迹 99
反相抽提 55
反义 RNA 165, 334
反转录聚合酶链反应 239
反转录酶 230
防护眼罩 96
放射自显影 182
非对称性 PCR 240
5′非翻译区 18
分子量标准 113
分子生物学中心法则 9
酚/氯仿抽提法 302
负对照 276

G

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 168, 271
高丰度 mRNA 76
功能基因组学 346
共有序列 10
胍-酸-酚抽提 46
胍-酸-酚抽提技术 44
胍盐缓冲液 45
寡核苷酸 162
灌胶盒 125
光活化生物素标记 302
光循环仪实时 PCR 系统 290
硅胶离心柱 73
硅胶滤器 55
硅烷化 71, 373
过氧化氢 31
过氧化物酶系统 192

H

核 RNA 38
核不均一 RNA 354
核酸酶保护实验 1
核酸探针 154
核糖核苷酸 2
核糖核酸酶 26
核糖核酸酶保护分析 199, 321
核糖体 70
核糖体 RNA 105
核逃逸实验 1, 37, 211, 213, 220, 321
恒态丰度 1
烘烤 151
化学发光法 181
化学发光检测法 191
化学基因组学 346
化学荧光法 181
灰度色标 138
灰度校正 138
混合相杂交 154

J

β-肌动蛋白 168, 270
基本局部比对搜索工具 350
基因表达系列分析 347
基因组 346
基因组 DNA 162
基因组学 346
基质辅助激光解吸电离飞行时间分析 348
甲醛 91, 109, 373
甲醛变性胶 110
甲醛变性琼脂糖凝胶电泳 66
甲醛变性系统 150
甲酰胺 7, 91, 109, 176, 373
兼并引物 248
碱印迹法 147
降落 PCR 244
胶片 130
胶片预闪 186
酵母 RNA 58
解链温度 6, 173
竞争 PCR 273, 283
聚丙烯树脂活塞 85
聚合酶链反应 163, 239
聚偏二氟乙烯膜 144
聚腺苷尾 19

聚酯碎末 85

K

开放阅读框 347
看家基因 105，168
宽铲 149
矿物油 311
扩增子 246

L

辣根过氧化物酶 192
冷冻组织 66
冷却电离耦合 289
离心柱层析法 167
离子强度 174
链霉蛋白酶 34
链霉亲和素 79，160
亮度 138
磷屏成像仪 194
硫氰酸胍 32
滤膜 143，183
滤色器 132
氯仿 33
氯化锂-尿素法 67
氯化铯 33，47

M

脉冲标记转录法 222
毛细转膜法 145
5′帽子 17
美国国家生物技术信息中心 349
密度分析 139
密度梯度离心 47，376
密码子 248
模板扩增程度 270
模板链 11
5′末端 4
3′末端标记 164，167
5′末端标记 163，167
末端脱氧核苷酸转移酶 231

N

内含子 12
内源标准 168
内源参照物 168，270
内源分子量标准 114
尼龙膜 143
黏度 175
黏性 175
黏性末端 236
鸟嘌呤 3
尿嘧啶 3
尿嘧啶-*N*-糖苷酶 254
尿素 109
凝胶过滤 167
凝胶盒 125

O

欧洲分子生物学试验室 349

P

平板筛选实验 356

Q

气溶胶 254
启动子 10
起始密码子 19
前导序列 18
8-羟基喹啉 33，42
切口平移法 163
亲和俘获 320
亲环蛋白 169，271
氢氧化钠 31
清洗滚轴 134
琼脂糖 383

R

热变性 241
热敏纸 130
热启动 PCR 255
热循环仪 254
日本 DNA 数据库 349

S

三氟乙酸铯 33，50
三氟乙酸铯梯度离心 50
三型双链特异核酸酶 334
上样缓冲液 125

生物素 79，159，189
生物信息学 346
N-十二烷基肌氨酸钠 32
十二烷基硫酸钠 31，32
实时 PCR 275，289，290
嗜热菌聚合酶 231
手持紫外灯 133
手套 29
手握式驱动匀浆器 64
数字图像 130
双链 cDNA 162
双链 RNA 334
双链 RNA 干扰 334
双氧水 31
水杨酸钠 186
随机引物法 163
6-羧基荧光素 290

T

探针 154
探针长度 174
探针浓度 174
体外翻译 1，97
体外转录 167
体外转录模板 275
同位素标记 156
图位克隆 345
图像分析软件 131，140
拖尾 65
脱氧核糖核苷酸 2

W

外显子 12
外显子捕获 12
外源参照物 272
外源分子量标准 113
微 RNA 334
微量移液器枪头 126
微型多孔斑点印迹装置 I 98
微型狭缝印迹装置 II 98
微阵列 326
微阵列分析 327
尾部序列 17
温度 173
温控轨道平台 217
涡轮印迹器 146，149
钨酸钙 185

X

细胞培养 63
细胞质 poly $(A)^+$ RNA 38
细胞质总 RNA 38
细胞总 RNA 38
狭缝印迹杂交 105
狭缝印迹自显影 99
显色检测法 181
显影 187
线粒体 16S rRNA 169，271
5′-腺苷三磷酸 2
腺嘌呤 3
相对丰度 268
硝酸纤维素膜 143
小鼠间皮瘤细胞系差异表达 329
校正 PCR 300
新鲜组织 65
胸腺嘧啶 3
溴酚蓝 314
溴化乙锭 92，119，369，385

Y

亚甲基蓝 123
亚甲基蓝染料 119
烟草酸焦磷酸酶 260
严谨度 5
盐酸胍 32
盐析法 378
氧钒核糖核苷复合物 27，34
胰蛋白酶 377
胰蛋白酶消化 215
乙醇沉淀探针 167
乙二醛 373
乙二醛变性系统 151
乙二醛/二甲基亚砜 109
乙二醛/二甲基亚砜变性法 111
乙二醛化 112
乙酸钾缓冲液 57
乙酸生物素 189
异硫氰酸胍 50

异戊醇 33
银染 122
引物退火 241
引物延伸 242
印制 326
荧光成像术 186
荧光法 181
荧光生成 5′-核酸酶实验 289
荧光素 161
有机溶剂抽提 359
预杂交 177，178
杂交 154，302

Z

增感屏 185
增强子 11
遮光罩 133
真空印迹法 146
正压转膜法 146
直接酶标法 191
植物 RNA 116
转录 9，14
转录调控 22
转录后基因沉默 334
转录后水平 22
转录起始位点 10
转录速率 211
转录物 5
转录组 346
转录组学 346
转移 RNA 169
锥形离心管 29
紫外线透射仪 133
紫外线照射交联 151
组蛋白 169，271
组织样品 63

其　他

AMV 反转录酶 316
AP 体系 191
argonaute 334
BioMax 胶片 184
BLAST 350
CCD 289
cDNA 229
cDNA 合成 229
cDNA 末端快速扩增 258
Centricon 系列 168
Church 印迹法 107
cpRNA 38
CsCl 梯度离心方法 47
CsTFA 50
DBM 纤维素 143
DDBJ 349
DDPCR 307
ddRNAi 334
ddRNAi 338
DEPC 30
Dicer 334
DIG 标记系统 193
λDNA 95
DNA 斑点印迹 101
DNA 甲基化酶 231
DNA 聚合酶 I 230
dsRNA 334，337
dsRNAi 334
DTT 28
Dynabeads 80，81
EB 染色 286
ECL 系统 191
*Eco*RI 甲基化酶 231
Elutip-d 微过滤柱 168
EMBL 349
FOTO/Analyst Archiver Eclipse 工作站 136
Förster 共振能量转移 290
G 盒 10
GC 盒 10
(G+C) 含量 174
Gel-Pro 分析器 136，137
GelStar 122
Genius 试剂盒 193
GRAIL 350
hnRNA 354
Hogness 盒 10
Klenow 片段 230
Kornberg 酶 230
Lumi Phos 480 192
Lumi-Phos 530 192

Lumi-Phos Plus 192
MALDI 348
miRNA 334
mRNA 38
mRNA 差异显示 307
mtRNA 38
NCBI 349
Northern 分析 91, 96, 142, 321
NP-40 40
oligo(dT)-微晶纤维素 87
oligo(dT)-纤维素 84
oligo(dT)-纤维素床 86
Optitrans 膜 143
O. T. C. 介质 66
pAW108 272
PCR 163, 239, 273
pH 174
poly (A)$^+$ RNA 38, 88
poly(A) 尾巴 19, 77
Polytron 破碎 64
PosiBlot 装置 146
Pribnow 盒 10
PTGS 334
PVDF 膜 144
Pwo 聚合酶 312
3′RACE 260
RACE 258
RISC 335
RLM-RACE 259
RNAi 333, 335
RNAlater 34, 72
RNase 26
RNase H 230
RNase 保护分析 197, 206
RNasin 28
RNA 斑点印迹 100
RNA 电泳 112
RNA 干扰 165, 333, 335
RNA "净化" 73
RNA 聚合酶 I 13
RNA 聚合酶 II 13
RNA 聚合酶 III 13
RNA 灵敏度指标 269
RNA 琼脂糖凝胶电泳 90
RNA 探针 166
RNA 诱导沉默复合物 335
rRNA 105, 115
RT-PCR 96, 239, 245
26S 蛋白酶体 271
S1 核酸酶 198, 231
S1 核酸酶保护分析 201, 204
SAGE 347
Sephadex G-25 柱 107
shRNA 335, 337, 338, 340
18S rRNA 90, 115, 169, 271
28S rRNA 90, 115, 169, 271
SSC 178
SSCP 321
SSPE 107, 178
STORM 860 荧光成像仪 131
SYBR 金 122
SYBR 绿 121, 369, 385
T_m 值 251
Taq 聚合酶 231, 312, 317
TA 克隆 263
TATA 盒 10
T4 DNA 聚合酶 231
tRNA 272
U6 335
UA-6 紫外吸收检测器 83
Ultrafree 过滤组合 168
UNG 254
3′UTR 区 19
VDR 27, 34
Western 353
XAR 胶片 184
ΦX174 DNA 95
XLS 胶片 184
X 射线胶片 183
X 射线胶片显影 182

生物科学可供图书书目

书　名	作　者	出版时间	开本	装订	单价(元)
酶的凝胶电泳检测手册	G. P. 曼琴科　著 华子春　主译	2007	16	精	108.00
蛋白质物理学 25 讲	[俄]A. V. 苏克尔斯泰因 O. B. 普季岑　著 朱厚础　聂世芳　译	2007	B5	平	32.00
原核生物系统学	陶天申等	2007	16	精	120.00
生命科学学习指导与考研指南系列——动物生理学　精要·题解·测试	陈　杰	2007	小 16	平	29.00
微生物功能基因组学	[美]周集中等著 张洪勋　赵立平　等译	2007.2	16	平	69.00
生物实验室系列——现代发育生物学实验指南	吴秀山　主编	2007	16	平	79.00
系统生物学基础(译)	北野宏明　编 刘笔锋　等译	2007	小 16	平	39.00
生物信息学——智能化算法及其应用(现代生物技术丛书)	王翼飞　史定华　主编	2007	16	平	35.00
生物实验室系列——人肿瘤细胞培养	R. 弗雷纳、[英]R. I. 弗雷谢尼　主编 章静波　等译	2006	小 16	平	49.00
生物实验室系列——PCR 技术实验指南(原著第 2 版)	[美]C. W. 迪芬巴赫,G. S. 德弗克斯勒　编 利　康　瞿礼嘉　主译	2006	16	平	75.00
生物实验室系列——植物分子生物技术应用手册	彭学贤	2006	16	平	49.00
生物实验室系列——小鼠胚胎操作实验手册	[美]安德拉斯·纳古　等著	2006	小 16	平	90.00
生物实验室系列——医学微生物学实验技术	管远志　王艾琳　等	2006	小 16	平	69.00
生物实验室系列——生物安全实验室建设	俞詠霆　等	2006	小 16	平	49.00
生物实验室系列——DNA 分子标记技术在植物研究中的应用	周延清	2005	小 16	平	39.00
生物实验室系列——分子生物学实验参考手册	[美]简·罗斯凯姆斯， 琳达·罗杰斯　编	2005	小 16	平	28.00
生物实验室系列——生物安全柜应用指南(原理、使用和验证)	张劲松	2005	小 16	平	30.00
生物实验室系列——流式细胞术原理与科研应用简明手册	[瑞士]瑞菲尔·努纳兹(Rafael Nunez)著	2005	小 16	平	18.00
生物实验室系列——PCR 最新技术原理、方法及应用	黄留玉　主编	2005	16	平	60.00
生物实验室系列——RNAi(基因沉默指南)	陈忠斌	2004	16	平	78.00
生物实验室系列　—转基因动物技术手册	劳为德	2004	16	平	75.00
生物实验室系列——现代生物科学仪器分析入门	徐金森　编著	2005 重印	16	平	28.00

续表

书　名	作　者	出版时间	开本	装订	单价(元)
生物实验室系列　拟南芥实验手册	Detlef Weigel, Jane Glazebrook	2004	16	平	50.00
生物实验室系列——生物化学实验技术	何忠效　主编	2005 重印	16	平	60.00
生物实验室系列——发酵工程实验技术	陈　坚　等	2004 重印	16	平	56.00
生物信息学与功能基因组学(译著)	孙之荣	2006	16	平	95.00
现代生物技术丛书——生物传感器	张先恩	2006	16	平	59.00
现代生物技术丛书——生物芯片技术	陈忠斌	2005	16	平	76.00
现代生物技术丛书——生物制药技术	朱宝泉	2004	16	平	60.00
现代生物技术丛书　生物工程下游技术(第二版)	刘国诠	2003 重印	16	平	45.00
现代生物技术丛书　农业生物工程(第二版)	养克强	2004	16	平	40.00
现代生物技术丛书　微生物工程	焦瑞身	2003	16	平	78.00
现代生物技术丛书　动物细胞工程	徐永华	2005 重印	16	平	35.00
现代生物技术丛书——植物细胞工程	朱至清	2005 重印	16	平	30.00
现代生物技术丛书——蛋白质工程	王大成	2003 重印	16	平	36.00
现代生物技术丛书——基因工程	陈永青　陆德如	2003 重印	16	平	30.00
现代生物技术丛书——环境生物工程	伦世仪	2002 重印	16	平	45.00
现代生物技术丛书——酶工程	罗贵民	2004 重印	16	平	50.00
现代生物技术丛书——生物技术与疾病诊断	卢圣栋	2003 重印	16	平	25.00
现代生物技术丛书——组织工程	杨志明	2003 重印	16	平	48.00
生物信息学与功能基因组学(译著)	孙之荣	2006	16	平	95.00
实用生物技术丛书　非热杀菌技术与应用	李汴生 阮　征	2004	16	平	35.00
实用生物技术丛书——动物细胞培养技术与应用	王　捷	2004	16	平	32.00
实用生物技术丛书　基因克隆技术在制药中的应用	杨汝德	2004	16	平	45.00
实用生物技术丛书　细胞融合技术与应用	罗立新	2004	16	平	25.00
实用生物技术丛书　酶的生产与应用	郭　勇	2005 重印	16	平	35.00
现代植物科学系列　植物组织培养导论	[印度]M. K. 拉兹丹　编著 肖尊安　译	2006	16	平	45.00
有机化学中生物转化(原著第四版)	[奥]库尔特·法贝尔　著 吉爱国　等译	2006	小16	平	39.00
生物化学仪器分析与实验技术	周先碗 胡晓倩	2005 重印	16	平	45.00

续表

书　名	作　者	出版时间	开本	装订	单价(元)
重组蛋白分离与分析	范代娣	2004	大 32	平	28.00
立体选择性生物催化	方唯硕	2004	16	精	120.00
生物体系中的化学测量	Kent K. Stewart Richard E. Ebel　著	2003	大 32	平	26.00
肽核酸	何　为 马立人	2003	大 32	平	30.00
生物超分子体系	李　惟	2003 重印	大 32	平	24.00
生物芯片(第二版)	马立人	2003 重印	大 32	平	35.00
生物医学传感器与检测技术	杨玉星　编著	2005	16	平	36.00
人胚胎干细胞——科学和治疗潜力概论	A. A. 基斯林,S. C. 安德森　著 章静波　等译	2005	16	平	29.00
疾病蛋白质组学	陈主初	2005	16	平	58.00
感染性疾病免疫学	[德]S. H. E. 考夫曼　等编 朱立平译	2005	16	平	86.00
医用分子生物学	杨吉成　陈子兴	2005 重印	16	平	58.00
病毒感染的分子生物学	李琦涵	2004	小 16	平	48.00
医用基因工程	杨吉成　缪竞诚	2003 重印	16	平	35.00
药物生物信息学(配光盘)	郑　珩　王　非	2004	16	平	45.00
微生物法医学:理论与技术	杨瑞馥　宋亚军	2005	16	平	55.00
现代微生物遗传学	陈三凤	2004 重印	16	平	35.00
植物生物技术导论(译著)	许亦农	2005	16	平	68.00
植物生物技术	肖尊安	2005	16	平	38.00
药用植物大规模组织培养	高文远　贾　伟　主编	2005	小 16	平	48.00
植物细胞培养工程	元英进	2004	小 16	平	38.00
中国生物技术产业发展报告(2006)	中国生物工程学会	2006	16	平	98.00
中国生物技术产业发展报告(2005)	中国生物工程学会	2006	16	平	98.00
中国生物技术产业发展报告(2004)	中国生物工程学会	2005	大 16	平	80.00
中国生物技术产业发展报告(2003)	中国生物工程学会	2004	大 16	平	60.00
中国生物技术产业发展报告(2002)	中国生物工程学会	2004 重印	大 16	平	45.00
生物技术投资必读——如何投资生物技术与生命科学板块	[美]唐马克	2005	大 32	平	28.00
海绵形态学辞典	[法]尼古拉·伯雷-伊斯奈尔特　等著	2003 重印	大 32	平	15.00
汉英生物技术词汇	安利佳　包永明	2003	32	精	60.00
英汉生物技术词汇	安利佳	2003 重印	大 32	精	68.00

邮购电话/传真：010-64518888 或 010-64518899　E-mail：yougou@cip.com.cn
如果您需要了解更多信息，欢迎登录我社网站：www.cip.com.cn

中科院植物所图书馆
S0052970

收到期 2008. 11. 16
来源 订购
63.00

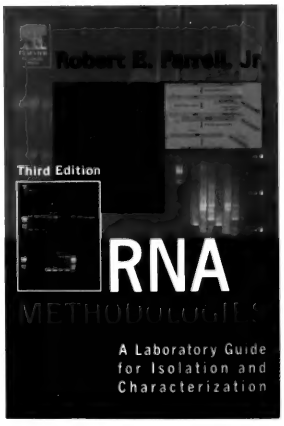
RNA操作，远比DNA操作困难，原因在于组成RNA的核糖核苷酸比组成DNA的脱氧核糖核苷酸多一个氧原子，它造成RNA的不稳定性。而RNA的完整性是RNA实验成功与否的关键，恰恰是这一点，常被某些实验者忽视。Robert E. Farrell, Jr 所著的《RNA分离与鉴定实验指南——RNA研究方法》一书，好就好在不仅提供了操作程序，更阐明了一些实验要点和注意事项……此书能帮助我国RNA研究工作者更好地理解RNA技术的内涵，能正确地使用不同的实验程序。希望此书的出版能促进我国RNA研究工作的开展。

——金由辛

内容导读

RNA的分离与鉴定构成了分子生物学的核心领域之一。本指南收录并详细介绍许多经过实验验证并优化的实验方案，用于RNA的分离与鉴定，注重阐述这些研究方法如何应用到基因表达的转录及转录后调控等研究工作之中。实验指南第三版经过国内有从事RNA技术研究多年的专家翻译为中文，体现了下列特色：

- 与第二版相比，新增RNA分离、高通量方法、生物信息学和RNAi等内容；
- 详细解释了RNA处理、储存和操作的实验细节；
- 扩充了RT-PCR、RACE等内容；
- 针对问题的处理建议，贯穿于全书。



分子生物学、遗传学、细胞生物学、发育生物学等领域的专家学者、研究生、高年级本科生，医学基础、农业生物技术等领域从事RNA工作的相关研究者，会从书中获取他们急需的RNA实验技术细节，进而判断实验中出现问题的原因，并采取合理的解决办法。

本中文版仅限在中国大陆境内销售，禁止出口

本书中文版由Elsevier授权出版

ISBN 978-7-5025-9625-5

销售分类建议：生物 / 生物技术

定价：63.00 元